

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Análisis Microbiológico del Agua de la Parroquia Borbón,  
Cantón Eloy Alfaro y su Asociación con la Enfermedad  
Diarreica.**

**Patricio Bueno León**

**Proyecto final presentado como requisito para la obtención del  
título de *Baccalaureus Scientiae* (B.S.) en Biotecnología**

**Quito**

**Diciembre de 2006**

**Universidad San Francisco de Quito**  
**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE APROBACION DE TESIS**

**Análisis Microbiológico del agua de la parroquia Borbón, cantón Eloy  
Alfaro y su Asociación con la Enfermedad Diarreica**

**Patricio Bueno León**

**Gabriel Trueba, PhD.**

Director de Tesis

-----

**María de Lourdes Torres, PhD.**

Miembro del Comité de Tesis

-----

**Karen Levy, MSc, MPH.**

Miembro del Comité de Tesis

-----

**Hugo Valdebenito, PhD.**

Decano del Colegio de Ciencias

Biológicas y Ambientales

-----

**Quito, diciembre de 2006**

**© Derechos de autor**

**Patricio Bueno León**

**2006**

## **DEDICATORIA**

A mis padres

Patricio y Anita,

a mis hermanos

Juan Pablo y Felipe Esteban,

a mis tíos:

Pablo y Teresita,

a mi abuelo,

afectuosamente.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero consignar mi profundo agradecimiento a la preclara Universidad San Francisco de Quito y de manera particular al personal directivo y docente del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, por haber facilitado mi formación y profesionalización.

A los miembros del Comité de Tesis, Dra. María de Lourdes Torres, Dr. Gabriel Trueba y Bióloga Karen Levy quienes me brindaron su asesoramiento invaluable a través de su extraordinaria competencia y empatía que tanto aprecio.

Al proyecto Ecodess y su Director, Dr. William Cevallos quien posibilitó mi participación en el mismo, tornando factible la ejecución de mi proyecto investigativo, y a todas las personas que de una u otra manera me ofrecieron su ayuda, mi gratitud inmarcesible.

## Resumen

La presente investigación se realizó en la población de Borbón, cantón Eloy Alfaro perteneciente a la provincia de Esmeraldas. Se colectaron y analizaron muestras de agua de doce casas de Borbón para determinar si presentan o no contaminación fecal.

En este estudio se realizaron tres pruebas: Análisis de la calidad de agua de Borbón(Esmeraldas), Identificación de organismos, Prueba de límites de detección.

Para el análisis de la calidad de agua de Borbón se hicieron cinco pruebas= filtración de membrana utilizando los medios de cultivo: ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®) y mEI(Difco®); Petrifilm(3M®) y análisis de colifagos; con estas pruebas se buscó la presencia de los siguientes indicadores de contaminación fecal: *Escherichia coli*, *Enterococcus* y colifagos. De estas cinco pruebas, la más sensible en la identificación de indicadores de contaminación fecal fue la de *Enterococcus* (medio mEI Difco®), por esta razón se recomienda realizar la prueba de *Enterococcus* porque resultó ser la más eficiente en este estudio.

En la prueba de identificación de organismos, se verificó si las colonias que crecieron en los medios ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®), mEI(Difco®) y en los Petrifilm(3M®) fueron *E. coli* o *Enterococcus*. Para verificar si las colonias aisladas de los medios ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®) y de los Petrifilm(3M®) fueron *E.coli* se efectuaron dos pruebas: Colilert e Indol, se confirmó que el 92,6% de colonias aisladas fueron *E.coli* con la prueba de Colilert y el 90,7% con la de Indol. Para verificar si las colonias aisladas del medio mEI(Difco®) fueron *Enterococcus* se hizo siete pruebas y se confirmó que el 83% fueron *Enterococcus*. Estos porcentajes elevados permiten deducir que los medios de aislamiento de *E.coli* y *Enterococcus* que se emplearon resultaron ser confiables.

En la prueba de límites de detección se hizo diez diluciones de distinta concentración, utilizando muestras de heces humanas. Con esas diluciones se realizaron cinco pruebas= filtración de membrana con los medios: ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®), mEI(Difco®); Petrifilm(3M®) y análisis de colifagos. El medio en el que

se encontró indicadores de contaminación fecal hasta en las diluciones menos concentradas fue ml(Difco®), por lo tanto este medio se lo puede emplear para determinar la presencia de *E.coli* en distintas concentraciones.

La presencia de *E.coli*, *Enterococcus* y colifagos en las muestras de agua analizadas indica que si hubo contaminación fecal. Esta contaminación del agua es la principal causa de enfermedades gastrointestinales en los pobladores de Borbón.

## Abstract

This study presents the results of an investigation carried out in the population of Borbón, Cantón Eloy Alfaro, Esmeraldas Province. Water samples were collected and analyzed from twelve houses in Borbón to determine whether they presented with fecal contamination.

Three analyses were carried out: an assessment of the quality of water of Borbón; confirmation of organisms; and a detection limit experiment.

For the water quality analysis five tests were carried out to assess the presence of indicators of fecal contamination: membrane filtration using the cultivation media: ml (Difco®) and m-cB (Millipore Corporation®) to culture *E.coli* and mEI (Difco®) to culture *Enterococci*; Petrifilms(3M®) to culture *E.coli*, and a modified double-layer method to measure coliphage. Of these five tests, the most sensible in the identification of fecal contamination was the *Enterococcus* media (mEI Difco®). For this reason it is recommended to use the test for *Enterococcus*, because results showed it to be the most efficient method.

In the second analysis, confirmation of organisms, those organisms that grew in the media ml (Difco®), m-cB (Millipore Corporation®), mEI (Difco®) and in the Petrifilm (3M) were further evaluated to confirm that these organisms were indeed *E. coli* or *Enterococcus*. To confirm the presence of *E. coli*, two tests were carried out: Colilert and Indol. It was confirmed that 92.6% of the isolated colonies were identified as *E.coli* with the Colilert confirmation method, and 90.7% were confirmed with the Indol test. To verify *Enterococcus* a series of seven tests were carried out and 83% of the isolates were confirmed as *Enterococcus*. These high percentage confirmations suggest that the media used to culture *E.coli* and *Enterococcus* were reliable.

In the last analysis, limits of detection, ten dilutions of different concentrations were made using a fecal specimen. The same five tests were carried out as described above. The media in which fecal contamination was detected in even the least

concentrated dilutions was ml (Difco®), therefore this media can be used to determinate the presence of *E.coli* in variable concentrations.

The presence of *E.coli*, *Enterococcus* and coliphages in the water samples analyzed indicates high degrees of fecal contamination. This contamination of the water is the main cause of gastrointestinal diseases in the population of Borbón.

# Tabla de contenido

<b>1.INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>	
1.1.		
Diarrea.....	3	
1.1.1. Conceptualización		y
tipos.....	3	
1.1.2. Causas de		la
diarrea.....	4	
1.2. Diarrea y		el
agua.....	5	
1.3. Transmisión de		organismos
patógenos.....	5	
1.4. Microorganismos		
indicadores.....	6	
1.4.1. <i>Escherichia</i>		
<i>coli</i> .....	8	
1.4.2. <i>Enterococcus</i> .....	8	
1.4.3. Colifagos.....	9	
1.5. Métodos empleados para detectar la presencia de coliformes		
y <i>Enterococcus</i>		en
agua.....	10	
1.5.1. Filtración		de
membrana.....	10	
1.5.2. Prueba		de
Petrifilm(3M®).....	12	
1.5.3. Análisis		de
colifagos.....	13	
1.5.4. Identificación		de
organismos.....	14	
<b>2.</b>		
<b>JUSTIFICACION.....</b>	<b>16</b>	
<b>3.</b>		
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>	
3.1. Objetivo		
General.....	17	
3.2. Objetivos		
Específicos.....	17	
<b>4. AREA DE</b>		
<b>ESTUDIO.....</b>	<b>18</b>	
<b>5. MATERIALES Y</b>		
<b>METODOS.....</b>	<b>19</b>	
5.1. Materiales.....	19	
5.2. Métodos.....	22	
5.2.1. Colección, preservación y almacenaje		de
muestras.....	22	
5.2.2. Filtración		de
membrana.....	23	
5.2.3. Petrifilm(3M®).....	25	

5.2.4.	Análisis	de
colifagos.....	26	
5.2.5.	Identificación	de
organismos.....	27	
5.2.5.1.	Identificación	de <i>E.</i>
<i>coli</i> .....	27	
5.2.5.2.	Identificación	de
<i>Enterococcus</i> .....	28	
5.2.6.	Límites	de
Detección.....	29	
<b>6.</b>		
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>	
6.1. Variables que determinan la calidad del		
agua.....	30	
6.2. Recuento de <i>E.coli</i> en los petrifilm y en los medios ml y m-		
cB.....	33	
6.3. Recuento de <i>Enterococcus</i> en el medio		
mEl.....	35	
6.4. Recuento		de
Colifagos.....	36	
6.5. Comparación de los resultados entre los medios de cultivo empleados y		
entre los indicadores		
encontrados.....	37	
6.6. Identificación		de
organismos.....	38	
6.6.1. Identificación		de
<i>E.coli</i> .....	38	
6.6.2. Identificación		de
<i>Enterococcus</i> .....	39	
6.7. Límites		de
Detección.....	40	
<b>7.</b>		
<b>DISCUSION.....</b>	<b>4</b>	
<b>1</b>		
7.1. Comparación entre los medios de cultivo		
empleados.....	41	
7.2. Recuento de <i>E.coli</i> en los petrifilms y en los medios ml y m-		
cB.....	42	
7.3. Recuento de <i>Enterococcus</i> en el medio		
mEl.....	44	
7.4. Recuento		de
Colifagos.....	45	
7.5. Identificación		de
organismos.....	46	
7.5.1. Identificación		de
<i>E.coli</i> .....	46	
7.5.2. Identificación		de
<i>Enterococcus</i> .....	47	
7.6. Límites		de
Detección.....	48	
<b>8.</b>		
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>4</b>	
<b>9</b>		
<b>9.</b>		
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>5</b>	
<b>0</b>		
<b>10.</b>		
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>5</b>	
<b>3</b>		

## Lista de Tablas, Gráficos y Anexos

<b>TABLAS.....</b>	<b>5</b>
<b>8</b>	
Tabla # 1. Principales causas de morbilidad en 1999 en el cantón Eloy Alfaro.....	58
Tabla # 2. Comparación de la incidencia de enfermedades.....	58
Tabla # 3. Agentes infecciosos que causan diarrea en niños.....	59
Tablas # 4.1.- 4.12. Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a las doce casas analizadas, y el promedio total de <i>E.coli</i> para cada casa.....	59
Tabla # 5. Promedio de <i>E.coli</i> (UFC/100ml) por medio de cultivo en cada casa.....	65
Tabla # 6. Promedio y valores máximo y mínimo (UFC/100ml) de <i>Enterococos</i> por casa.....	66
Tabla # 7. Promedio de Colifagos (# de placas) por casa.....	66
Tabla # 8. Número de casos negativos por medio de cultivo.....	66
Tabla # 9. Análisis estadístico de los casos positivos por medio de cultivo.....	67
Tabla # 10. Análisis estadístico de todos los datos por medio de cultivo.....	67
Tabla # 11. Comparación de los medios de cultivo, utilizando los resultados de los casos positivos.....	67
Tabla # 12. Comparación de los medios de cultivo, utilizando los resultados totales.....	68
Tabla # 13. Comparación de los microorganismos indicadores encontrados, utilizando los resultados de los casos positivos.....	68
Tabla # 14. Comparación de los microorganismos indicadores encontrados, utilizando los resultados totales.....	68
Tabla # 15. Resultados de la verificación de <i>E.coli</i> en las pruebas de Colilert e Indol.....	69
Tabla # 16. Resultados de la verificación de <i>Enterococcus</i> en las pruebas realizadas.....	70
Tablas # 17 – 19. Resultados de la prueba de límites de detección(tres ensayos).....	70
Tabla # 20. Investigaciones semejantes realizadas en Ecuador y en otros países.....	72
Tabla # 21. Comparación de los resultados obtenidos en Borbón con otras investigaciones similares.....	73
<b>GRAFICOS.....</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	
Gráfico # 1. Tipos de fuente de donde se tomó las muestras de agua.....	74
Gráfico # 2. Tipos de recipiente de donde se tomó las muestras de agua.....	74
Gráfico # 3. Recipientes tapados vs recipientes no tapados.....	75
Gráfico # 4. Tipo de tratamiento del agua que hacen los habitantes de Borbón dentro de sus casas.....	75

Gráficos # 5 – 9. Diagramas de caja de los resultados obtenidos en los recipientes tapados y en los no tapados en cada medio de cultivo empleado.....	76
Gráficos # 10 – 14. Diagramas de caja de los resultados obtenidos con cada medio de cultivo empleado para cada tipo de recipiente.....	78
Gráfico # 15. Comparación de las medias de los resultados positivos para los cinco medios utilizados.....	81
Gráfico # 16. Comparación de las medias de los resultados totales para los cinco medios empleados.....	81
Gráfico # 17. Comparación de las medias de los resultados positivos para los microorganismos indicadores buscados.....	82
Gráfico # 18. Comparación de las medias de los resultados totales para los microorganismos indicadores buscados.....	82
Gráfico # 19 – 27. Resultados de la prueba de límites de detección para <i>E.coli</i> .....	83
Gráfico # 28. Resultados de la prueba de límites de detección para colifagos.....	87
Gráfico # 29. Promedio de la concentración de <i>E.coli</i> en cada medio empleado.....	88
Gráfico # 30. Promedio del crecimiento de <i>Enterococcus</i> por casa.....	88
<b>ANEXOS.....</b>	<b>8</b>
<b>9</b>	
Anexo I. Preparación de medios de cultivo y reactivos.....	89
Anexo II. Formulario de recolección de muestras.....	95

## **1. Introducción**

El agua contaminada es una de las principales vías de transmisión de enfermedades gastrointestinales, entre otras la diarreica (Madigan, 2004); estas infecciones gastrointestinales son unas de las principales causas de muerte en niños, se estima que la mortalidad infantil nacional es de 44 por 1.000 nacidos vivos (ENDEMAIN 94).

En los niños menores de cinco años, las enfermedades respiratorias agudas y las diarreicas agudas son las más frecuentes. En el grupo de niños comprendidos entre los cinco y nueve años de edad la mayor causa de muerte se debe a las enfermedades infecciosas, especialmente las diarreicas y las respiratorias. La enfermedad diarreica corresponde al 9% de muerte infantil en el Ecuador (OPS, 1998).

En el 2004, la diarrea se constituyó en una de las diez principales causas de muerte infantil en el Ecuador, con 112 decesos que representan el 2,8% de mortalidad en este grupo (INEC, 2005). A nivel de toda la población ecuatoriana, en este mismo año la diarrea causó 334 muertes, de las cuales 19 ocurrieron en la provincia de Esmeraldas (INEC, 2004).

La diarrea, se constituyó en el 2005 en la segunda enfermedad por su frecuencia en el Ecuador, con una cantidad de 366.324 casos de un total de 13`215.089 habitantes. De éstos, 190.525 corresponden a la región Costa, de los cuales 17.473 se ubican en la provincia de Esmeraldas (Aguilar, 2005).

La presente investigación se realizó dentro del proyecto Ecodess (“Enfermedades diarreicas y cambios medioambientales: Un experimento natural”), que es patrocinado y financiado por los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU y administrado por la U.C. Berkeley, Trinity Collage y la Universidad San Francisco de Quito, trabaja en la costa norte del Ecuador, en la provincia de Esmeraldas, específicamente en la población de Borbón (perteneciente al cantón Eloy Alfaro).

Los objetivos primordiales que persigue el proyecto Ecodess son:

- Comprender cómo los cambios en el ambiente natural y social, mediados por la construcción de una carretera, afectan la epidemiología de patógenos que son los causantes de las enfermedades diarreicas.
- Determinar si la asociación de patógenos de transmisión fecal oral con pobreza y marginación, produce la diarrea como un resultado predecible.
- Observar cuan sensibles son los patógenos de enfermedades diarreicas a cambios en ambientes humanos, incluyendo el nivel socio económico, la disponibilidad de recursos y los contactos sociales entre individuos.
- La construcción de una nueva carretera en la Costa Norte de Ecuador provee un experimento natural valioso y una oportunidad única para examinar estas interrogantes. Esta carretera une comunidades previamente remotas a redes locales, regionales, nacionales e internacionales de bienes, servicios y gente, creando nuevas conexiones comerciales y sociales entre ellos

(<http://www.sph.umich.edu/scr/ecodess/home.php>).

Cuando el proyecto empezó a trabajar en esta zona, lo primero que realizó fue una exploración relativa de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil en 14 centros de salud de la zona, concluyéndose que la diarrea es una de éstas (Tabla # 1). Además se comparó la incidencia de la diarrea (también de la tifoidea y salmonelosis) con los promedios de esta enfermedad a nivel provincial y con los datos a nivel nacional (Tabla # 2). De acuerdo a estos datos, se infiere que la diarrea es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil en el Ecuador, particularmente en la provincia de Esmeraldas; por esta razón se consideró prioritario realizar una amplia investigación en esta zona, para analizar, mediante métodos microbiológicos el agua que consumen sus pobladores y determinar la presencia o ausencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal, para de esa manera establecer si esta agua es óptima o no para el consumo humano.

## **1.1. Diarrea**

### **1.1.1. Conceptualización y Tipos**

Se considera como un aumento en el peso diario de las heces, por encima de los 200g, usualmente el paciente tiene un incremento anormal en la fluidez de las heces y la frecuencia de defecación (Harrison, 1998). De acuerdo a las características que presenta la diarrea, a su origen y al tiempo de duración, se puede considerar los siguientes tipos:

- *Diarrea Aguda*: tiempo de duración menor a dos semanas.
- *Diarrea Crónica*: cuando dura de dos a tres semanas
- *Diarrea del Viajero*: se conoce con este nombre, a aquéllas que afectan a personas de países desarrollados, quienes se infectan al viajar a países en desarrollo, dónde ingieren alimentos o toman agua que han sido contaminados con heces fecales.

- *Diarrea de origen desconocido*: cuando los estudios que se realizan al paciente no logran revelar el diagnóstico exacto.
- *Incontinencia*: suele confundirse con diarrea, pero no lo es. Se trata de un problema de incontinencia fecal, las personas no pueden controlar sus esfínteres. (Wyngaarden, 1985).

### 1.1.2. Causas de la Diarrea

Las principales causas de la diarrea son:

- Intoxicación por alimentos
- Consumo de fármacos
- Intoxicación por metales pesados
- Algunas enfermedades pueden desencadenar una diarrea, como: síndrome de colon irritable, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome de mala absorción intestinal, enfermedad de Crohn anal, etc (Wyngaarden, 1985).
- Infecciones bacterianas:
  - a) Mediada por enterotoxinas, por ejemplo: *E.coli* que produce enterotoxinas: termolábil, termoestable o los dos tipos.
  - b) Mediada por invasión de la mucosa e inflamación, por ejemplo: *E. coli* invasor, *Shigella* y *Campylobacter*.
  - c) Mediada por una combinación entre enterotoxinas e invasión., por ejemplo: *Salmonella*.
- Infecciones Virales, por ejemplo diarreas producidas por rotavirus, virus de la hepatitis, etc.
- Infecciones Parasitarias, por ejemplo diarreas producidas por *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Criptosporidium*, etc (Tabla # 3) (Organización Panamericana de la Salud, 1987).

## **1.2. Diarrea y el agua**

Muchos de los microorganismos patógenos que son transmitidos por el agua (bacterias, virus y protozoos) se encuentran usualmente en el tracto intestinal del hombre y se excretan del cuerpo a través de las heces (Pepper, 2004).

Existe controversia sobre los programas de saneamiento, higiene y mejoramiento de las redes que constituyen las fuentes para determinar una mejor calidad de agua, y confirmar a la vez cómo la calidad de agua influye en la incidencia y aumento de casos de diarrea (Madigan, 2004).

El agua limpia y potable es esencial para la salud pública. Para lograr este objetivo se debe disponer de métodos adecuados para obtener agua de calidad y protocolos eficaces que permitan valorar los métodos químicos y biológicos utilizados en el tratamiento del agua. Si se altera la calidad del agua puede transmitirse enfermedades infecciosas muy graves e incluso producir la muerte.

Al ser el agua la fuente principal de la enfermedad diarreica, es indispensable potabilizarla. Primero se realiza un tratamiento físico y químico del agua, luego se aplican métodos microbiológicos perfectamente estandarizados para comprobar si el proceso señalado fue adecuado (Madigan, 2004).

## **1.3. Transmisión de organismos patógenos**

Los microorganismos patógenos se diseminan con facilidad si las condiciones de higiene y salud pública no son buenas. A lo largo de la historia de la humanidad se ha producido el contacto de materia fecal con la boca, el mismo que resulta más frecuente en algunos países en desarrollo donde las condiciones sanitarias y sistemas

de agua potable son escasos o nulos. Por lo tanto los microorganismos y parásitos patógenos se transmiten por medio de la vía fecal-oral (Mims, 2004).

#### **1.4. Microorganismos Indicadores**

“La presencia de pocos microorganismos no patógenos en el agua puede ser tolerable” (Madigan, 2004). A algunas de estas bacterias se las cataloga como *indicadores* de contaminación fecal, las cuales forman parte de la flora normal del tracto intestinal del hombre y de otros animales de sangre caliente. Se encuentran por lo general en las heces y son excretadas en grandes cantidades, de  $10^9$  a  $10^{10}$  bacterias por gramo de heces. La presencia de microorganismos intestinales en el agua nos indica que ésta ha sido contaminada con heces y posiblemente con organismos patógenos, por lo tanto la misma no se considera apta para el consumo humano (Feachem, 1983).

Los criterios que permiten definir a un organismo como indicador ideal, son:

- El indicador debe ser adecuado para el análisis de todo tipo de agua: de grifo, fluvial, subterránea, recreativa, de estuario, agua marina, residual, etc.
- Su hábitat debe ser exclusivamente el intestino y su origen fecal, cuando se encuentra en el medio ambiente.
- Su presencia nos indica la existencia de agentes patógenos entéricos.
- Debe sobrevivir más tiempo que el patógeno entérico más fuerte.
- No debe reproducirse fuera del intestino.
- El método que se emplea para el indicador debe ser de alta especificidad, es decir no puede dar resultados positivos con otras bacterias; además el método debe tener una sensibilidad elevada, esto es, detectará inclusive la presencia de niveles bajos del indicador.
- Se encontrará en grandes cantidades.

- De fácil detección y contabilización.
- El indicador debe ser inocuo para la población, es decir un habitante normal de la flora intestinal de personas sanas.
- Su nivel en el agua contaminada debe tener una relación directa con el grado de contaminación fecal (Prescott, 2004; Feachem, 1983; Paz y Miño, 2003).

Entre los principales organismos que son considerados como buenos indicadores figuran los siguientes: coliformes, *Enterococcus* y colifagos; los dos primeros son bacterias y los últimos son virus.

Los coliformes son bacterias que pertenecen a la familia: Enterobacteriaceae; representan el 10% de microorganismos intestinales en los seres humanos y en otros animales (Prescott, 2004).

Se ha considerado tradicionalmente a los coliformes como organismos indicadores de contaminación fecal en el control de calidad del agua destinada al consumo humano, debido a que son más resistentes que las bacterias patógenas intestinales y porque su origen es principalmente fecal. Por tanto, su ausencia indica que el agua es bacteriológicamente segura. En general, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo. Por su amplia diversidad los coliformes se han sido dividido en dos grupos: los coliformes totales, que comprende la totalidad del grupo, y los coliformes fecales, aquellos de origen intestinal.

Se define como coliformes fecales a aquellos que fermentan la lactosa a 44,5 – 45,5°C (termotolerantes) (Paz y Miño, 2003), a este grupo pertenece casi exclusivamente *E.coli*, por esta razón es considerado como el mejor indicador (gold estándar) de contaminación fecal del agua (Moe et al., 1991; Mara, 2003).

**1.4.1. *Escherichia coli*:** Se encuentra en grandes cantidades en el tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente; es una bacteria inocua en personas sanas, se lo utiliza como indicador de contaminación fecal debido a que no crece en el ambiente (Burrows, 1989).

Las cepas de *E. coli* que causan diarrea son:

- *E. coli* enterotoxigénicas: produce dos toxinas termolábiles y termoestables, las cuales causan diarrea.
- *E. coli* enterohemorrágicas: produce *verotoxina*, que es la causa de la diarrea hemorrágica y síndrome urémico hemolítico.
- *E. coli* enteroinvasivas: produce enfermedades invasivas en el colon, lo que desencadena en diarrea con sangre.
- *E. coli* enteropatogénicas: genera diarrea en niños y bebés, no produce enfermedades invasivas ni toxinas (Madigan, 2004).

**1.4.2. *Enterococcus*:** Se localizan comúnmente en las heces de seres humanos y de otros animales de sangre caliente. La presencia de *Enterococcus* en agua es una indicación de contaminación fecal y de la existencia posible de patógenos entéricos (Cabelli, 1979).

Antiguamente a los *Enterococcus* se los clasificaba dentro del género *Streptococcus* con el que comparten muchas características, pero en la actualidad se ha identificado 15 especies, de las cuales dos son de importancia médica: *E. faecalis* y *E. faecium* (Harrison, 1998; Mims, 2004).

El hábitat normal de los *Enterococcus* es el intestino de los seres humanos y los animales. Se piensa que la mayor parte de infecciones se adquieren por vía endógena, pero puede haber infección cruzada en pacientes hospitalizados (Mims, 2004).

Cada vez se utiliza con mayor frecuencia los *Enterococcus* fecales como organismos indicadores de contaminación fecal, en especial en aguas salobres y marinas, debido a que mueren a una velocidad mucho más lenta que los coliformes fecales; por esa razón se convierten en indicadores más confiables para estos casos (Prescott, 2004).

**1.4.3. Colifagos:** Los virus que infectan al tracto intestinal de humanos y animales se los conoce como **entéricos**, son excretados en las heces y por lo tanto se encuentran en el agua contaminada por ellas. Los virus que infectan bacterias se conocen como bacteriófagos y los que infectan a las bacterias coliformes se los llama colifagos (Pepper, 2004).

Algunos de los argumentos que apoyan el uso de colifagos como buenos indicadores de contaminación fecal del agua, son:

- Los fagos se encuentran abundantemente en agua residual y contaminada.
- Las poblaciones de colifagos son mucho más grandes que las de los enterovirus.
- Los colifagos son incapaces de reproducirse fuera del huésped bacteriano.
- Se pueden aislar y contar usando métodos sencillos.
- Se obtienen resultados más rápidos cuando se analizan colifagos que cuando se trabaja con enterovirus.
- Algunos colifagos son tan resistentes como los enterovirus a los procesos de desinfección.

Los colifagos se relacionan directamente con su huésped bacteriano específico *E. coli*. Cuando las condiciones ambientales son desfavorables, los coliformes fecales no son buenos indicadores de contaminación fecal, ya que desaparecen rápidamente; por

consiguiente, es mejor usar microorganismos más resistentes como los colifagos que reflejan mucho mejor los niveles de enterovirus (Kott et al, 1978; Borrego et al, 1987).

Se ha reportado casos de enfermedades entéricas debido a consumo de agua, en la que no se detectó coliformes fecales, como *E. coli*, ni *Enterococcus*, en esos casos se utilizaron colifagos (Borrego et al., 1987). Los fagos han sido aislados de aguas contaminadas junto a los coliformes totales y a los termotolerantes (Grabow et al. 1984).

## **1.5. Métodos empleados para detectar la presencia de coliformes y *Enterococcus* en el agua**

### **1.5.1. Filtración de membrana**

Actualmente existen dos procedimientos empleados para detectar la presencia de coliformes en el agua: el método del número más probable (MPN) y el de filtración en membrana (MF).

El método MPN emplea un medio de cultivo líquido en tubos de ensayo; para lo cual se añade diferentes volúmenes de las muestras de agua a los tubos que contienen caldo lactosado. Los tubos en los que se observa formación de gas se consideran positivos y se los inocula en caldo de bilis con lactosa verde brillante. A los que resultan positivos se les realiza una tinción Gram; si son bacilos Gram negativos, no esporulados y producen gas a partir de lactosa, se reportan como positivos (Prescott, 2004).

El método de MF consiste en filtrar al menos 100ml de la muestra de agua a través de una membrana estéril la cual retiene las bacterias. La membrana se coloca sobre la superficie de una placa que contiene un medio de cultivo llamado ml(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®), los cuales son selectivos para el crecimiento de *E.coli*; y mEI(Difco®) para *Enterococcus*. Se cuenta las colonias azules y a partir de ese valor,

se puede calcular el número de estas bacterias presentes en dicha agua (Brenner, K.P, 1993; Levin, M.A., 1975; Madigan, 2004).

El agar ml(Difco®) detecta la presencia de las enzimas bacterianas:  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucoronidasa que son producidas por los coliformes totales y por *E.coli* respectivamente (www.rapidmicrobiology.com).

El agar mEI(Difco®) contiene cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) y contiene el sustrato: indoxyl  $\beta$ -D-glucósido que logra una coloración azul cuando reacciona con una enzima bacteriana presente en los *Enterococcus*:  $\beta$ -glucosidasa.

(<http://oh.water.usgs.gov>).

Entre las ventajas de la utilización de este método se puede mencionar:

- Buena reproducibilidad
- Ocasionalmente suele obtenerse los resultados en un solo paso
- Los filtros pueden transferirse entre distintos medios
- Es factible procesar grandes volúmenes de la muestra para aumentar la sensibilidad de la prueba
- Ahorro considerable de tiempo
- Es posible utilizarlo *in situ*
- Bajo costo en relación al método MPN

Entre las desventajas, se puede citar:

- El agua muy turbia puede limitar el volumen de las muestras
- Una alta concentración bacteriana causa un excesivo crecimiento
- Los metales y fenoles pueden absorberse a los filtros e inhibir el crecimiento (Prescott, 2004).

### 1.5.2. Prueba de Petrifilm(3M®)

Las placas Petrifilm(3M®) contienen medio deshidratado. En ellas se puede agregar un volumen de 1ml de algunas sustancias como agua, leche, etc.; presenta un fondo cuadrulado que facilita el conteo de bacterias (Pepper, 2004).

Las placas Petrifilm(3M®) para el recuento de *E.Coli*/Coliformes (EC), es un medio de cultivo fabricado que contiene un sistema de nutrientes como: Rojo Bilis Violeta (VRB) que es un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de la actividad enzimática de la glucoronidasa (BCIG) y el indicador tetrazolium que facilita la enumeración de las colonias. Estas placas se emplean con frecuencia en las industrias de alimentos y bebidas (FDA, 1998).

Algunas de las ventajas que ofrece la utilización de las placas Petrifilm(3M®) sobre otros medios, son:

- Este método es más rápido que otros.
- Se ocupa menos espacio
- Son más fáciles de usar
- No es necesario preparar medio de cultivo
- Es más económico que otros medios

Pese a las bondades señaladas, este método adolece también de algunas desventajas, como:

- No se puede distinguir la morfología de las colonias
- Se usa 1ml de muestra por cada placa Petrifilm(3M®), que constituye un volumen muy pequeño; pudiendo inclusive ser aparentemente no representativo con respecto al número real de microorganismos detectados en dicha muestra (Tortorelli, 2000).

### 1.5.3. Análisis de Colifagos

El método que suele utilizarse para determinar la presencia de colifagos se conoce como: Plaqueo; el cual consiste en mezclar la dilución de la suspensión que contiene el virus con agar líquido y la bacteria huésped; toda esta mezcla se vierte en una placa petri que contiene agar nutritivo. La bacteria huésped que se ha extendido por el agar forma una cobertura lisa (césped), cada partícula viral que se fija a una célula bacteriana puede causar la lisis de dicha bacteria, lo cual se observa macroscópicamente mediante la formación de zonas claras llamadas *placas* o *calvas* (Madigan, 2004). Se necesita un solo fago para producir una placa de lisis en un cultivo bacteriano que crece en medio sólido; cuando el virión ingresa en una bacteria da inicio al ciclo lítico. La progenie del primer ciclo infecta a las bacterias cercanas y así sucesivamente hasta producir un círculo de lisis que se ensancha y puede llegar a medir algunos milímetros de diámetro (Espejo, 1980).

Este método se emplea para determinar la presencia de colifagos en las muestras de agua; su presencia es un indicador de contaminación fecal. La solución que contiene *E. coli* CN-13 se la mezcla con la muestra de agua y ácido nalidíxico, esto se vierte en una placa petri que contiene el medio de cultivo TSA(Difco®) con ácido nalidíxico. A las 24 horas se leen los resultados, los sitios donde no existe crecimiento bacteriano evidencia la presencia de colifagos; finalmente se cuenta el número de éstos en toda la caja (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1997).

El ácido nalidíxico es un antibiótico perteneciente al grupo de las quinolonas, actúa dentro de las bacterias e inhibe la acción de la girasa del ADN; esto impide la duplicación y favorece la desintegración de la bacteria a la que ataca. Son susceptibles a este antibiótico casi el 100% de cepas de *E.coli* y de *Proteus mirabilis*, además de otros coliformes como *Klebsiella* y *Enterobacter*, mientras que las *Pseudomonas* y *Streptococcus faecalis* son resistentes (Rodríguez, 2005).

#### 1.5.4. Identificación de Organismos

Para comprobar si una colonia es *E. coli* o *Enterococcus*, existen pruebas para cada uno de ellos. Para detectar la presencia de *E. coli* se efectúan dos pruebas: La del Indol mediante el reactivo de Kovacs y la de Colilert (Idexx Laboratories). Si utilizamos la prueba del Indol, se reporta como positivo cuando en pocos segundos se produce la formación de un anillo rojo en la parte superior del tubo (Mac Faddin, 2003).

La prueba de Colilert permite establecer la presencia de *E. coli* y coliformes fecales en general. Para ello se emplea el sustrato definido de Colilert, se añade una muestra de agua de 100ml a un medio especializado que contiene o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) y 4-metilum-beliferil- $\beta$ -D-glucurónido (MUG), como nutrientes. Si hay coliformes, el medio toma una coloración amarillenta a las 24 horas de ser incubado a 35°C, debido a la hidrólisis de ONPG, que libera o-nitrofenil. Para comprobar que se trata de *E.coli* se emplea una lámpara de luz UV; *E. coli* transforma MUG, como resultado de lo cual se observa fluorescencia (Prescott, 2004). En consecuencia, una coloración amarilla prueba la presencia de coliformes fecales y si se observa fluorescencia implica que se trata de *E. coli* (Pepper, 2004; Covert, 1989).

Para comprobar si son *Enterococcus*, se los cultiva en medio BHI y BEA; si estas pruebas resultan positivas se realiza una tinción Gram y si son cocos Gram positivos se trata de *Enterococcus* (EPA, 2002).

En este proyecto se analizó las muestras de agua provenientes de Borbón para identificar microorganismos indicadores de contaminación fecal como: *E.coli*, *Enterococcus* y colifagos, utilizando cinco pruebas diferentes: filtración de membrana con los medios ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®), mEI(Difco®); Petrifilm(3M®)

y análisis de colifagos. Además se hicieron tres pruebas para verificar si una colonia es *E.coli* y siete pruebas para comprobar si una colonia es *Enterococcus*. Finalmente se hizo la prueba de límites de detección para determinar cuál de las cinco pruebas empleadas en este estudio es más efectiva en la identificación de indicadores. Esta investigación busca aportar con los resultados a la población de Borbón, para que sus habitantes tomen conciencia de la calidad de agua que consumen.

## **2. Justificación**

Las razones que apoyan la realización de este proyecto son varias y se describen a continuación.

Al ser *Escherichia coli*, *Enterococcus* y colifagos microorganismos indicadores de contaminación fecal es indispensable determinar su presencia o ausencia en el agua que consume la gente, para tomar ciertas medidas que permitan tener una fuente de agua segura y que no ponga en riesgo la salud de las personas.

Por otro lado, la costa norte de la provincia de Esmeraldas, especialmente la parroquia de Borbón, ha sido víctima del abandono por parte de las autoridades sanitarias nacionales y locales; razón por lo que esta población no cuenta con un sistema eficiente de alcantarillado ni agua potable.

Las aguas residuales de Borbón son arrojadas al río y no reciben ningún tipo de tratamiento, por lo que las personas que viven en las orillas del río y toman el agua de éste para satisfacer sus necesidades vitales, corren el riesgo de adquirir enfermedades transmitidas a través del agua contaminada.

En Borbón existe un sistema de tratamiento de agua, pero ésta no es potable. Desde enero de 2006 empezó a funcionar la planta de tratamiento de agua, la

misma que se encuentra en el río Cayapas, sin embargo lo único que se hace con el agua es pasarla por filtros de piedra, ripio y arena, pero con eso lo único que se logra es eliminar organismos grandes y basura pero no microorganismos patógenos.

El servicio de agua entubada no funciona las 24 horas del día y no todas las viviendas disponen de él, por eso la gente debe almacenar el agua en condiciones no muy higiénicas, lo que facilita la transmisión de enfermedades.

Las personas de las viviendas que no tienen el servicio de agua entubada, se ven obligadas a recogerla de otras fuentes como: lluvia, pozo, río; arriesgándose a contraer enfermedades que pueden transmitirse a través de estas fuentes de agua.

Estos servicios básicos escasos y deficientes crean un ambiente de insalubridad, por lo que la incidencia de enfermedades infecto-contagiosas como la diarrea son mayores en relación a zonas que tienen buenos sistemas de alcantarillado y agua potable.

Todas las razones expuestas justifican la realización de este proyecto, cuya finalidad además de científica es aportar con los resultados a la población de Borbón, para que en base a estas cifras puedan tener un conocimiento claro de la calidad de agua que consumen.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo General**

Determinar por medio de técnicas microbiológicas estandarizadas, si el agua que consumen y utilizan los pobladores de Borbón tiene contaminación fecal.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Hacer una vigilancia activa de la calidad de agua en once casas de Borbón que fueron escogidas al azar.
- Establecer las prácticas adecuadas de colección, almacenamiento y uso del agua dentro de la casa.
- Comparar los límites de detección en cinco pruebas “estándares” para determinar la calidad de agua.
- Verificar la presencia de *E. coli* y *Enterococcus*.

### **4. Área de Estudio**

La investigación se realizó en una zona que había sido previamente seleccionada por el Proyecto Ecodess; esto es, la provincia de Esmeraldas, ubicada en la costa norte del Ecuador, específicamente en la región que comprende el sistema fluvial de los ríos Santiago-Cayapas-Onzole. Aquí se había elegido 22 comunidades, siendo una de las más significativas la parroquia Borbón, perteneciente al cantón Eloy Alfaro, debido a su extensión y densidad poblacional. Borbón se encuentra en el sitio de unión de dos grandes ríos el Cayapas y el Santiago.

Mediante un proceso aleatorio se seleccionó once viviendas de la citada parroquia, para realizar un análisis del agua que utilizan sus propietarios en diversas actividades domésticas, tales como: preparación de alimentos, como bebida, para bañarse, lavar alimentos, lavar ropa y otras actividades que involucren su empleo.

Las muestras tomadas en la parroquia Borbón, fueron trasladadas a la ciudad de Quito, y todo su procesamiento o análisis se efectuó en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad San Francisco de Quito.

## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1. Materiales**

#### **5.1.1. Colección, preservación y almacenamiento de muestras de agua**

- Funda Nasco Whirl-Pak®
- Termo
- Gradilla para fundas Nasco Whirl-Pak®
- Formularios

#### **5.1.2. Filtración de membrana**

- Equipo de filtración
- Membranas de filtración
- Cajas petri
- Pipetas de 5ml
- Estufa
- Lámpara de luz UV

#### **5.1.3. Petrifilm(3M®)**

- Placas *E.coli* Petrifilm(3M®)
- Pipeta de 1ml
- Estufa

#### **5.1.4. Colifagos**

- Tubos de dilución con tapas negras (16x125mm)
- Tubos de ensayo con tapas blancas (13x100mm)
- Cajas Petri (100 x 15mm)
- Gradillas (16mm & 13 mm)
- Pipeta de 1ml

#### **5.1.5. Identificación de Organismos**

Para el proceso de validación se utilizó los mismos materiales empleados en la filtración de membrana y en los Petrifilm(3M®), pero además los siguientes:

- Vaso de precipitación
- Tubos de dilución con tapas negras (16x125mm)
- Tubos de ensayo con tapas blancas (13x100mm)
- Cotonetes estériles
- Asa
- Palillos estériles
- Placas portaobjetos
- Microscopio

#### **5.1.6. Límites de Detección**

Se empleó los mismos materiales de la filtración, Petrifilm(3M®) y colifagos, y adicionalmente cotonetes estériles y tubos Falcon (Becton Dickinson Labware®).

#### **5.1.7. Colección, preservación y almacenamiento de muestras de agua**

- Muestras de aguas domiciliarias y de sus fuentes de abastecimiento
- Hielo

#### **5.1.8. Filtración de membrana**

- Muestras de agua de las casas de Borbón
- ml agar (Difco®)
- mEI(Difco®) agar
- PBS
- Alcohol

\* Ver Anexo I.

#### **5.1.9. Petrifilm(3M®)**

- Muestras de agua de Borbón

#### **5.1.10. Colifagos**

- *E.coli* CN-13
- TSA(Difco®)
- TSA(Difco®) con ácido nalidíxico
- Muestras de agua de Borbón
- Caldo TSB
- PBS

\* Ver Anexo I.

#### **5.1.11. Identificación de Organismos**

##### **5.1.11.1. Identificación de *E.coli***

- Frascos Colilert
- Agua destilada estéril

- Reactivo de Kovac's

#### **5.1.11.2. Identificación de *Enterococcus***

- Caldo BHIB
- Agar BHIA
- Agar BEA
- BHIB con 6.5% de CINA
- Tinción Gram

\* Ver Anexo I.

#### **5.1.12. Límites de Detección**

- Heces humanas
- Agua destilada estéril

### **5.2. Métodos**

#### **5.2.1. Colección, preservación y almacenaje de muestras**

Previamente al análisis de las muestras de agua de Borbón, se eligió aleatoriamente once viviendas, de las cuales se tomaría las correspondientes muestras. Al consultar a las personas de las once casas si deseaban participar en este estudio, se les aseguró que no se iba a revelar en el trabajo final los domicilios de dónde se obtuvo las muestras, por tal razón a estas viviendas se las numeró del uno al once indistintamente.

En Borbón un asistente se encargó de tomar las muestras de agua en cada una de las once casas seleccionadas, actividad que se cumplió en forma semanal, para lo que se requirió diariamente recolectar muestras de dos a tres casas. Por cada casa se tomó un máximo de tres muestras por semana, dos de las cuales correspondían al domicilio

y la otra a la fuente de abastecimiento de la misma. Además se tomó diariamente una muestra de agua de la casa del Proyecto Ecodess en Borbón. Todas las muestras se registraron en un formulario (Anexo II).

El agua se recolectó en fundas Nasco Whirl-Pak® y se almacenó a  $4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; el tiempo máximo de espera para su análisis fue de 24 horas. Se rotulaba la funda con el número de la casa, la hora y fecha de colección y se llenaba el formulario correspondiente.

Las muestras fueron tomadas a partir de las cinco de la tarde y enviadas esa noche a Quito, en un termo pequeño con hielo para garantizar su conservación; se adjuntaba los formularios. El análisis se efectuaba el día siguiente en el laboratorio de Microbiología de la USFQ.

La recolección de muestras en Borbón se cumplió los días lunes, martes, miércoles y jueves; en tanto que su procesamiento se efectuó en la ciudad de Quito los martes, miércoles, jueves y viernes; aunque, esporádicamente variaba los días debido a situaciones imprevistas.

Los resultados de las cinco pruebas realizadas con cada muestra se observaba el día siguiente y se los registraba.

### **5.2.2. Filtración de Membrana**

Por medio de este método se determinó la presencia o ausencia de *E. coli* en las muestras de agua de las once casas elegidas, para ello se utilizó dos medios de cultivo: mI(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®) (Anexo I). También por este método se detectó la presencia o ausencia de *Enterococcus* en las mismas muestras mencionadas, pero se empleó otro medio de cultivo, el mEI(Difco®) (Anexo I).

La metodología que se aplicó fue la siguiente:

- Se rotuló las cajas con el número y volumen de la muestra, así como la fecha del análisis. Estos datos se registró también en la hoja de resultados.
- Se esterilizó el aparato de filtración con alcohol y fuego, al igual que las pinzas.
- Se ubicó el aparato de filtración en la boca del erlenmeyer.
- Con las pinzas se colocó un filtro debajo del embudo y luego se aseguró todo el equipo de filtración con pinzas grandes.
- Se colocó 10 o 50 ml de la muestra de agua por el embudo y se filtró este volumen con la bomba hacia la base del erlenmeyer. Para mayor precisión se utilizó una pipeta de 5 ml, cualquiera que fuere el volumen de agua a ser filtrado. El volumen final de la muestra era de 10 ml, cuando ésta era tomada de la llave, pozo, río o si no había recibido tratamiento alguno por parte de los moradores de la casa. Cuando la muestra correspondía a agua lluvia, o había sido tratada por parte de las personas que la consumen, se utilizó un volumen final de 50 ml.
- Se agregó aproximadamente de 5-10 ml de PBS (Anexo I) y con la bomba se lo filtró hacia el fondo del erlenmeyer.
- Se retiró las pinzas grandes que sujetaban el equipo de filtración y luego se tomó el filtro con las pinzas estériles y se lo colocó en las cajas petri que contienen los medios mI(Difco®) y mEI(Difco®).
- Hasta aquí el proceso fue similar para los tres medios de cultivo; a excepción del m-cB(Millipore Corporation®), el cual presentó una pequeña variación; las cajas petri que se utilizaron para este medio tenían una superficie de algodón que ocupaba toda el área de la caja. El medio m-cB(Millipore Corporation®) es un líquido azul que viene en un tubo plástico pequeño cuyo contenido se depositó sobre el algodón de la caja petri; finalmente sobre esta superficie se colocó el filtro.
- Después de procesar todas las muestras, diariamente se realizó un control negativo mediante el uso de PBS.

- Se introdujo las cajas en la incubadora por el lapso de 18 a 24 horas. Aquellas que contenían los medios mI(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®), es decir en las que crece *E. coli*, se colocaron a una temperatura de 37° C; en cambio las que llevan el medio mEI(Difco®), en las que crecen *Enterococcus*, se las sometió a una temperatura de 41° C.
- Al día siguiente, se contó las colonias de *E. coli* y *Enterococcus*, ambas son de color azul. Para observar las colonias pequeñas se aprovechó su fluorescencia mediante una lámpara de luz UV. Se registraron los resultados en el cuaderno de laboratorio.

### **5.2.3. Petrifilm(3M®)**

- Se rotuló el Petrifilm(3M®) con el número de la muestra de agua y la fecha respectiva.
- Se colocó 1 ml de la muestra sobre el Petrifilm(3M®), utilizando una micropipeta de igual capacidad.
- Se presionó con el aparato de formar círculos para que el agua ocupe toda la superficie y no se forme burbujas.
- Se incubó por 24 horas a 37° C.
- A las 24 horas se observó los resultados, para lo cual se contó las colonias azules y se registró en el cuaderno de laboratorio.

### **5.2.4. Análisis de Colifagos**

La víspera del procesamiento de la muestra se sembró la cepa *E. coli* CN-13 en un tubo con caldo TSB y se lo incubó por 24 horas a 37° C. Al siguiente día se analizó las muestras, para lo cual:

- Se calentó los tubos de agar TSA (Anexo I), un tubo por cada muestra de agua, más otro para control negativo y se agitaron mientras se calentaban. Se agregó cloruro de sodio para aumentar la temperatura de ebullición del agua. Cuando el caso ameritaba, se calentaba el tubo de agar en un horno microonda. Luego de que el agar TSA de los tubos se disolvió completamente se los dejó enfriar. Posteriormente se agregó 0.7 ml de la solución de ácido nalidíxico a cada tubo con agar.
- Se rotuló unos tubos de ensayo vacíos con el número de muestra al igual que las cajas petri que contenían agar TSA.NA.(Difco®)(Anexo I), pero en estas últimas se anotó también la fecha en la que se realizó el análisis. Con la micropipeta de 1 ml se añadió 3 ml de cada muestra de agua en el tubo de ensayo correspondiente. Se agregó 3 gotas de *E. coli* CN-13 a cada tubo; luego se los tapó y mezcló su contenido.
- Enseguida se mezcló el contenido de los dos tubos, se procedió a tapar, mezclar e inmediatamente verter sobre la caja petri de TSA.NA.(Difco®) correspondiente. Se dejó solidificar.
- Finalmente se incubó de 18 a 36 horas, luego de cuyo lapso se contó el número de placas (colifagos) existentes en la caja y se anotó los resultados en el cuaderno de laboratorio.
- Paralelamente al estudio descrito se efectuó un control negativo para lo cual se utilizó PBS, en lugar de la muestra de agua y se realizó el mismo proceso.

#### **5.2.5. Identificación de Organismos**

Para esto se cumplió con el procedimiento de filtración de membrana, empleando otras muestras adicionales, pero correspondientes también a la población de Borbón; luego se aisló las colonias que crecen en los filtros de membrana y se realizó los procedimientos indicados a continuación.

Por medio de estos métodos, se utilizó “posibles” colonias de *E.coli* y *Enterococcus*, para comprobar su presencia.

#### **5.2.5.1. Identificación de *E. coli***

Para verificar que una colonia es *E.coli* se realizaron dos pruebas: Colilert e Indol.

- **Colilert:** se añadió un frasco de Colilert (Anexo I) a 100 ml de agua destilada esterilizada, luego se repartió volúmenes de 10 ml en 10 tubos. De las colonias de *E. coli* que crecieron en los Petrifilm(3M®) y en los medios ml(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®) se tomó una para hacerla crecer en cada tubo. Después se incubaron los tubos por 24 horas a 37°C para observar los resultados al siguiente día. Los tubos que presentaron una coloración amarilla fueron aquellos que contenían coliformes totales. Se empleó una lámpara de luz UV para observar fluorescencia en los tubos, si eso ocurría se reportaba a esa colonia como *E.coli*.
- **Indol:** utilizando un cotonete estéril, se tomó una colonia de los Petrifilm(3M®) o de los medios ml(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®) y se diluyó con 5 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo, se incubó 24 horas a 37°C. Al siguiente día se agregó una gota del reactivo de Kovac's; la formación de un anillo rojo en la parte superior del tubo indicaba que se trataba de una colonia *E.coli*.

#### **5.2.5.2. Identificación de *Enterococcus***

Una vez que las colonias crecieron en el medio mEI(Difco®), con un asa estéril se tomó una de esas colonias y se transfirió a un tubo con caldo BHIB, a continuación se estrió la colonia aislada en el tubo que contiene agar BHIA (el agar que se encuentra

en el tubo tiene la disposición de pico de flauta). Los tubos con caldo BHIB se incubaron por 24 horas a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , mientras que los tubos de agar se incubaron por 48 horas a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

A las 24 horas de incubación del caldo BHIB, se realizó los siguientes análisis:

- Se introdujo un palillo estéril en el caldo BHIB y luego se pinchó el mismo palillo en el tubo con agar BEA(bilis esculina)
- Se introdujo un asa estéril en el caldo BHIB, para luego insertar el asa en otro tubo con caldo BHIB.
- Se sumergió el asa estéril en el caldo BHIB, luego se introdujo el asa en un tubo con caldo BHIB con 6.5% de NaCl.

El tubo con agar BEA y el otro con caldo BHIB con 6.5% de NaCl se incubaron por 48 horas a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ; en cambio el tubo con caldo BHIB se lo incubó por 48 horas a  $45^{\circ}\text{C}$ .

Luego de que se incubó el agar BHIA por 48 horas, se realizó un frotis del crecimiento bacteriano presente en el tubo, y con ello se hizo una tinción Gram.

Las bacterias que fueron cocos Gram positivos, que hidrolizaron la esculina en el medio BEA (lo cual se observó por la formación de un precipitado negro o marrón en el tubo), y que crecieron en el caldo BHIB a  $35^{\circ}\text{C}$  y a  $45^{\circ}\text{C}$ , así como las que crecieron en el caldo BHIB con 6.5% de NaCl, se reportaron como *Enterococcus*.

#### **5.2.6. Límites de Detección**

Se realizó un análisis para determinar los límites de detección de cada prueba y así establecer la más eficiente en la identificación de *E. coli*, *Enterococcus* y colifagos.

Una dilución es el proceso mediante el cual se prepara una solución menos concentrada a partir de una más concentrada (Chang, 1999). Cuando se diluye una solución, el volumen aumenta y la concentración disminuye, pero la cantidad total de soluto permanece constante (Garzón, 1990).

El método utilizado se conoce como: Diluciones en Serie, consistente en partir de una dilución madre o stock hasta llegar a diluciones menos concentradas (Rubinson, 2000). Para esto se realizó varias diluciones partiendo de muestras de heces humanas. Se colocó 50 ml de agua destilada al tubo # 1, y 45 ml en cada uno de los tubos, del # 2 al # 10.

Se tomó un poco de la muestra de heces con un cotonete estéril y se la diluyó en el tubo # 1 (dilución # 1); luego con una micropipeta se tomó 5 ml de la dilución # 1 y se la pasó al tubo # 2 (dilución # 2). De esta última dilución se tomó 5 ml para transferirlos al tubo # 3 (dilución # 3), y se siguió con el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución # 10.

Con cada una de las diez diluciones se realizaron las siguientes cinco pruebas: filtración de membrana utilizando los medios: ml(Difco®), mEI(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®); Petrifilm(3M®) y colifagos. Para la prueba de filtración de membrana se filtró 10ml de dilución por cada medio de cultivo(ml, mEI, m-cB), para las placas Petrifilm(3M®) se utilizó 1ml de dilución y para la prueba de colifagos 3ml, todo este proceso se lo realizó con las diez diluciones.

El volumen final empleado por cada dilución para las cinco pruebas realizadas fue de 34ml, para evitar posibles riesgos o accidentes debido a una probable pérdida involuntaria de líquido se prepararon diluciones con un volumen mayor a los 34ml que fueron utilizados, por eso se partió con 50ml para la dilución #1 y 45ml para las diluciones #2 - # 10.

Todo el procedimiento descrito se lo ejecutó tres veces para tener resultados más confiables. Una vez obtenidos los datos de estas pruebas se realizó un análisis comprobatorio de las cinco pruebas para determinar la más precisa.

## **6. Resultados**

### **6.1. Variables que determinan la calidad del agua**

Antes de tomar las muestras de las viviendas, el recolector llenó el formulario respectivo (ver Anexo II), el cual presenta algunos parámetros importantes con respecto al agua de esa casa; entre éstos, los de mayor trascendencia para ser analizadas son:

- La fuente de donde proviene la muestra
- El recipiente del que se tomó la muestra
- Si el recipiente estaba tapado o no
- Si recibió algún tratamiento por parte de los habitantes de la vivienda investigada.

Estos resultados figuran en los Gráficos # 1, 2, 3, 4. Algunas de las opciones de respuesta que presenta el formulario, no fueron tomadas en cuenta en estos gráficos debido a que en ninguna de las casas encuestadas se escogió esas alternativas.

En todo el estudio se analizó un total de 141 muestras, de las cuales 15 fueron tomadas de la llave de la casa del proyecto Ecodess, 33 directamente de las fuentes de abastecimiento para cada casa, mientras que las 93 restantes se tomaron del agua que la gente almacenaba en sus viviendas para utilizarla con diversos fines. Los resultados que se observan en los Gráficos # 1 – 4, corresponden a estas 93 muestras.

En el Gráfico # 1 podemos observar que las principales fuentes de las que la población obtiene el agua son de la llave (40,9%) y de la lluvia (34,4%); constituyendo el pozo y

el río otras fuentes de abastecimiento de agua, pero en menor proporción con respecto a las dos primeras.

El Gráfico # 2 nos indica claramente que los tanques son los principales recipientes en los cuales la gente almacena el agua, debido a que su porcentaje es superior al 50%; le siguen en importancia las pomas y baldes con promedios menores.

Se puede ver en el Gráfico # 3 que el 52,7% de las muestras de agua almacenadas en los domicilios se encontraban en recipientes cerrados con tapa, mientras que el 47,3% estaba en recipientes sin ningún tipo de cubierta; las dos opciones exhiben una proporción semejante, puesto que ambas están muy cercanas al 50%.

El 60,21% de muestras, corresponde a recipientes en los cuales no se hizo ningún tipo de tratamiento casero del agua; en el 29% de los casos la gente utilizó avate, sin embargo a éste no se lo puede considerar como un tratamiento idóneo para mejorar la calidad del agua, ya que lo único que éste combate son las plagas de insectos. Un tratamiento propiamente dicho corresponde al 9.7% que utilizó cloro y apenas el 1% (perteneciente a una muestra) hirvió el agua (ver Gráfico # 4).

Las muestras de agua fueron tomadas de recipientes que en algunos casos estaban cerrados y en otros no, esta variable se tomó en cuenta para comparar si existe mayor o menor presencia de indicadores fecales cuando el recipiente estaba tapado o no (ver Gráfico # 5 – 9).

Se puede observar en los Gráficos # 6 – 9 que se encontró una mayor cantidad de microorganismos indicadores en las muestras que se tomaron de recipientes que estaban abiertos en relación a las muestras que se tomaron de recipientes cerrados, esto se puede ver en los resultados obtenidos en los medios ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®), mEI(Difco®), TSA.NA.(Difco®). Una excepción son las placas Petrifilm(3M®), dónde se encontró indicadores de contaminación fecal en la

misma proporción en las muestras tomadas de recipientes tapados y no tapados (ver Gráfico # 5).

Otra de las variables que se consideró fue el tipo de recipiente de donde se tomaron las muestras, lo cual se puede observar en los Gráficos # 10 – 14. En los Gráficos # 10, 11, 12, 14 se observa que en los Petrifilm(3M®), ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®) y TSA.NA.(Difco®), las muestras tomadas de baldes presentaron una mayor cantidad de indicadores en relación a las muestras tomadas de otros recipientes, el segundo tipo de recipiente donde se encontró un gran número de microorganismos fueron los tanques. En el medio mEI(Difco®) se encontró la mayor cantidad de *Enterococcus* en las muestras tomadas de tanques, seguidas de las muestras recolectadas de baldes (ver Gráfico # 13).

Por lo tanto estos dos recipientes, baldes y tanques, se los podría considerar como los más inseguros, ya que presentan cifras altas de microorganismos, sin embargo esta aseveración no se la puede hacer, ya que el número de muestras que se tomaron de ollas y galones fue muy pequeña, por lo tanto, se debe contar con una mayor cantidad de datos para poder concluir sobre este tema.

## **6.2. Recuento de *E.coli* en los Petrifilm(3M®) y en los medios ml(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®)**

Las muestras de agua enviadas desde Borbón a la ciudad de Quito, fueron sometidas al procesamiento respectivo, para lo cual se revisó los formularios adjuntos para saber la cantidad de muestra que se filtraría.

En todas las muestras se filtró un volumen de 10 ml a excepción de aquellas tomadas del agua lluvia, ya que ésta se la considera limpia debido a su reducido o ningún contacto mantenido con la superficie terrestre y con las personas, razón por la que se

utilizó un volumen de 50 ml de la misma, para así tener mayores posibilidades de encontrar *E.coli*, *Enterococcus* y colifagos.

Después de la incubación por 24 horas a 37°C de los Petrifilm(3M®), y de las cajas con los medios ml(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®) se procedió a contar las colonias de *E.coli*, que presentaban una coloración azul, cuyos resultados se registraron en el cuaderno de laboratorio y se los puede ver en las Tablas # 4.1 – 4.12. Para expresar los datos bajo un mismo parámetro y hacer más fácil los cálculos, se utilizó la siguiente fórmula (EPA, 1978):

$$\frac{\text{Número de colonias de } E.coli}{\text{Volumen de muestra filtrado}} \times 100$$

**Número de colonias de *E.coli* contabilizadas, dividido para el volumen de agua de la muestra filtrado y multiplicado por 100 ml.**

Por medio de esta fórmula se obtuvo la cantidad de colonias de *E.coli* presentes en 100 ml de muestra, los resultados se reportan como UFC (Unidades formadoras de colonias) por 100 ml de agua. Los valores obtenidos de estos cálculos se pueden ver en las Tablas # 4.1 – 4.12.

El promedio general de todas las casas investigadas para cada medio (ver Tabla # 5), nos indica que en los Petrifilm(3M®) se encontró una mayor cantidad de colonias de *E.coli* por 100 ml de muestra, que equivale al 44,25%; el porcentaje para ml(Difco®) fue de 29,32%, mientras que el promedio más bajo se detectó con el medio m-cB(Millipore Corporation®) y correspondió al 26,42%.

### 6.3. Recuento de *Enterococcus* en el medio mEI(Difco®)

Luego de 24 horas de realizada la filtración de membrana, se procedió a contar el número de colonias de *Enterococcus* que crecieron en el medio mEI(Difco®), con cuyo dato se calculó, mediante la siguiente fórmula, el número de colonias de *Enterococcus* presentes en 100 ml de muestra (EPA, 1978).

**Número de colonias de *Enterococcus***

----- x 100

**Volumen de muestra filtrado**

**Número de colonias de *Enterococcus*, dividido para el volumen filtrado y multiplicado por 100 ml;** de esta manera se obtuvo la cantidad de UFC por 100 ml de muestra.

El promedio de colonias de *Enterococcus* en las muestras de agua de las doce casas analizadas fue de 343,38 *Enterococcus* por 100 ml de muestra; el valor y promedio más altos se registraron en la casa 4; así: el valor fue de 3330 colonias de *Enterococcus* por 100 ml de agua y el promedio máximo encontrado de 1193,63 *Enterococcus* por 100 ml de muestra (ver Tabla # 6).

El valor más bajo fue de cero en diez de las doce casas investigadas. En las dos restantes cuyos códigos son 1 y 7, los valores más bajos fueron 66 y 10 colonias de *Enterococcus* por 100 ml de agua respectivamente. El promedio más bajo se ubicó en la casa 11 con 82,8 colonias de *Enterococcus* por 100 ml de muestra (ver Tabla # 6).

#### 6.4. Recuento de Colifagos

Al día siguiente de haber realizado el experimento de los colifagos se procedió a leer los resultados; esto es, se contó en cada caja el número de placas o calvas, las mismas que son zonas perfectamente redondeadas donde no crece *E.coli* CN-13, debido a la presencia de los colifagos que atacan a esta bacteria.

Para calcular el número de colifagos presentes en 100 ml de agua se utilizó la misma fórmula empleada para *E.coli* y *Enterococcus*:

$$\frac{\text{Número de placas de colifagos}}{3\text{ml}} \times 100 \text{ ml}$$

**Número de placas de colifagos dividido para 3 ml, correspondiente al volumen de la muestra utilizada, multiplicada por 100 ml.**

Como se ve en la Tabla # 7, el promedio de colifagos presentes en las muestras de las doce casas analizadas es relativamente alto (168,16 placas por 100 ml de agua), las casas 7, 8 y 5 presentan cifras muy altas de colifagos que bordean las 300 y 400 placas por 100 ml de agua. En ciertas casas no se pudo contabilizar el número exacto de placas, debido a la gran cantidad de éstas, por lo que se reportaron como incontables, el mayor valor que se pudo contabilizar fue de 94 placas en la casa 5.

Las casas 3 y 6 presentaron el menor número de placas, por lo que registran los promedios más bajos; así, la casa 3 evidenció la presencia de colifagos solamente en una de las catorce muestras que se recogió de esta vivienda; en las trece muestras restantes estos virus estaban ausentes.

En todas las casas el valor más bajo de colifagos presentes en sus muestras fue de cero, a excepción de la número 7, cuyo valor fue de uno. Si bien el promedio de

colifagos por 100 ml es bajo para las casas 3 y 6, lo ideal sería su ausencia total, por lo que tampoco se puede confiar por completo en la seguridad de la calidad de esta agua.

#### **6.5. Comparación de los resultados entre los Medios de Cultivo empleados y entre los Indicadores encontrados**

Se comparó los resultados obtenidos en los cinco medios de cultivo empleados para detectar contaminación fecal: Petrifilm(3M®), ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®), mEI(Difco®), TSA.NA.(Difco®) mediante la prueba estadística ANOVA.

Debido a la presencia de una gran cantidad de casos negativos, que son aquellos donde no se determinó la presencia de UFC (ver Tabla # 8), se hizo dos análisis: de los casos positivos y del total de casos (ver Tablas # 9,10).

Con estos datos, se puede ver que el medio de cultivo más sensible en la identificación de indicadores de contaminación fecal (es decir el medio en el que se encontró una mayor cantidad de microorganismos indicadores) es el medio mEI(Difco®) tanto para los resultados positivos como para los totales (ver Gráficos # 15,16). Mientras que de los cinco medios empleados los menos sensibles fueron las placas Petrifilm(3M®) para los resultados positivos y totales (ver Gráficos # 15,16). La comparación entre los diferentes medios de cultivo utilizados en este estudio se puede ver en las Tablas # 11,12.

De los microorganismos indicadores, objetivos de esta investigación: *E. coli*, *Enterococcus* y colifagos, los que se encontraron en mayor cantidad fueron los *Enterococcus* y los que menos los colifagos tanto para los resultados positivos como para los totales (ver Gráficos # 17,18). La comparación entre los indicadores empleados en este estudio se puede ver en las Tablas # 13,14.

## **6.6. Identificación de Organismos**

Para verificar si una colonia es *E.coli* o *Enterococcus* se utilizó indistintamente muestras de las casas de Borbón como de los ríos que lo atraviesan. Lo que se pretendía era verificar si las colonias que crecían eran *E.coli* o *Enterococcus*, y no medir el grado de contaminación de las muestras.

### **6.6.1. Identificación de *E.coli***

En total se aisló 54 posibles colonias de *E.coli* para este experimento; se realizó dos pruebas: Colilert e Indol. La prueba de Colilert permitió determinar si una colonia aislada de los medios ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®) y Petrifilm(3M®) pertenece al grupo coliforme, lo cual se confirmaba si a las 24 horas de haber sembrado las colonias de *E.coli* en agua destilada se observaba una coloración amarilla en el tubo. En los tubos positivos se utilizó una lámpara de luz UV para determinar fluorescencia, lo que probaba la existencia de *E.coli*.

De las 54 posibles colonias de *E.coli* aisladas de los medios: ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®) y Petrifilm(3M®), solo una resultó negativa a la primera prueba de Colilert (no se observó una coloración amarilla en el tubo); ésta correspondió al medio ml(Difco®) y a la muestra tomada de la llave de la casa de Ecodess en Borbón. Las 53 colonias restantes resultaron positivas, es decir, coliformes totales.

Sin embargo, al ver el resultado de fluorescencia (segundo resultado de la prueba de Colilert) se observó que cuatro de los 54 tubos dieron negativo a esta prueba (no se observó fluorescencia en los tubos), por lo tanto estas bacterias no fueron *E.coli*; tres de éstas fueron aisladas del medio ml(Difco®) y pertenecían a muestras tomadas de la

llave de la casa de Ecodess y de una vivienda particular de Borbón, la otra colonia fue aislada del medio m-cB(Millipore Corporation®) y provenía de una muestra tomada de la llave de la vivienda antes mencionada. Los otros cincuenta tubos fueron positivos, es decir *E.coli*.

Para confirmar estos resultados se realizó la prueba del Indol, de esta manera se observó que en cinco de los 54 tubos no se formó el anillo rojo por lo que se reportaron como negativos; los 49 tubos restantes fueron positivos, (ver Tabla # 15). De las cinco colonias negativas, dos fueron aisladas de los Petrifilm(3M®), dos del medio ml(Difco®) y una de m-cB(Millipore Corporation®). Por otro lado, tres pertenecían a muestras tomadas de la llave y dos a las del río. En tres de estos cinco tubos se confirmó los resultados negativos obtenidos con la prueba de Colilert, (ver Tabla # 15).

#### **6.6.2. Identificación de *Enterococcus***

Se aisló 24 colonias del medio mEI(Difco®) para comprobar si son *Enterococcus*. En total se hicieron siete pruebas, (ver Tabla # 16), y sólo una colonia dio negativo para todas las pruebas, por lo tanto esa bacteria no era un *Enterococcus*; esta colonia pertenecía a una muestra tomada de la llave de la casa de Ecodess.

De otra muestra tomada de la llave de un domicilio de Borbón, se observó una colonia que no creció en el medio BHIB + NaCl, tampoco creció ni formó precipitado en el medio BEA; sin embargo al realizar el Gram se observó que se trataba de un coco Gram positivo.

Una colonia perteneciente a una muestra del río dio positivo en todas las pruebas a excepción de BHIB + NaCl. Otra colonia de una muestra de una vivienda resultó

positiva para todas las pruebas; es decir, resultó coco Gram positivo, a excepción de BEA en la cual no precipitó.

### **6.7. Límites de Detección**

En las cinco pruebas realizadas para determinar la más efectiva para la identificación de *E.coli*, se observó que en la primera y segunda dilución resultó incontable el número de colonias, pero a medida que bajaba la concentración también disminuía el número de colonias; es así que en las últimas diluciones de los Petrifilm(3M®) y m-cB(Millipore Corporation®) hubo una ausencia de colonias, en especial en la dilución # 10. En el medio ml(Difco®) también existe una disminución progresiva del número de colonias a medida que baja la concentración de la dilución, es decir se encontró una mayor cantidad de bacterias en las diluciones más concentradas (# 1, 2, 3) y casi no se identificó colonias en las diluciones menos concentradas (# 8,9,10)(ver Gráficos # 19-28).

En el medio mEI(Difco®) sólo se encontraron *Enterococcus* en la primera dilución; de la segunda hasta la décima hubo ausencia de colonias. En los ensayos dos y tres de la prueba de límites de detección se observó la ausencia de colifagos en las cajas petri, a excepción de la dilución uno del ensayo tres, donde las placas ocupaban toda la superficie de la caja por lo que se reportó como incontable; pese a ello, estos resultados son confiables porque a lo largo de la investigación se mantuvo un orden descendente en el número de colifagos encontrados a medida que disminuía la concentración de la dilución. Contrariamente, los resultados obtenidos en el primer ensayo son totalmente atípicos y alteran por completo la secuencia descendente que se esperaba, lo cual se atribuye a una posible contaminación de la suspensión bacteriana de *E.coli* CN-13, esta cepa se utilizó como control en la prueba de análisis de colifagos.

## **7. Discusión**

### **7.1. Comparación entre los Medios de Cultivo empleados**

De las cinco pruebas de contaminación fecal que se realizaron en esta investigación, la más sensible para la identificación de microorganismos indicadores resultó ser la prueba de *Enterococcus* para la que se utilizó el medio de cultivo: mEI(Difco®), mientras que la prueba menos sensible fue la de Petrifilm(3M®). La sensibilidad con los medios ml(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®) en la identificación de *E.coli* fue similar y sigue en importancia a los resultados obtenidos con mEI, en cambio la sensibilidad en el medio TSA.NA.(Difco®) fue baja y es cercana a la obtenida con Petrifilm(3M®) (ver Gráficos # 15,16).

Por lo tanto la prueba de filtración de membrana que se realizó con los medios de cultivo: mEI(Difco®), ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®), fue donde se observó mayor sensibilidad, eso puede deberse a que para estas pruebas se utilizó un volumen mayor de muestra (5-10ml) que para las otras pruebas donde se utilizó 3ml y 1ml en los medios TSA.NA.(Difco®) y Petrifilm(3M®) respectivamente.

### **7.2. Recuento de *E.coli* en los Petrifilm(3M®) y en los medios ml(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®)**

Como se puede observar en el Gráfico # 29, el promedio más alto de colonias de *E.coli* se encontró en los Petrifilm(3M®). Una de las razones para eso puede deberse a que el procesamiento de la muestra es más fácil que en los medios ml(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®) y por lo tanto las probabilidades de contaminación en los Petrifilm(3M®) es mucho menor con relación a los otros medios.

Otra de las posibles razones por las que hay una menor contaminación en los Petrifilm(3M®) respecto de los otros medios empleados, radica en que el agua de las muestras se colocó directamente de la funda Nasco Whirl-Pak® a la placa Petrifilm(3M®); en cambio cuando se emplea los medios ml(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®), el agua primero se filtra y luego se retira la membrana del equipo de filtración para colocarla en el medio respectivo. En todo ese proceso podría generarse accidentalmente una contaminación de la membrana, debido a microorganismos presentes en el ambiente.

Es probable, que cuando se colocaba el agua de las muestras y PBS para ser filtrados podría haberse producido un escape de alguna parte del volumen por pequeñas aberturas que quedaban entre los componentes del equipo de filtración, lo cual pudo haber influenciado en el conteo final de los indicadores que se buscaban.

El PBS siempre se añadió directamente, esto es, del frasco al equipo de filtración hasta llegar aproximadamente a una línea que tiene el embudo y que indica que se ha agregado 10ml del mismo, como establece el respectivo protocolo; sin embargo este volumen no pudo haber sido exacto, ya que no se utilizó ninguna pipeta u otro instrumento para medir dicho volumen, tal como lo dice el protocolo “añadir directamente del frasco el volumen necesario de buffer estéril hasta la línea que indica el embudo” (Bordner, 1978).

Del total de microorganismos indicadores de contaminación fecal encontrados en muestras de agua de Borbón, el 25% correspondió a *E. coli*, ese porcentaje es bajo si lo comparamos con los resultados obtenidos en otras investigaciones (ver Tablas # 20, 21). En un estudio realizado en el Oriente ecuatoriano, se obtuvo un porcentaje elevado de *E.coli* (74%), siendo esta bacteria la que más se encontró (Donoso, 2001).

También se encontró grandes cantidades de *E.coli* en unas investigaciones realizadas en Chile y Argentina, donde se obtuvo porcentajes de 65 y 60,5% de *E.coli*

respectivamente, siendo esta bacteria la más frecuente en las muestras de agua analizadas en estos estudios (Tamagnini et al, 2001; Castillo et al, 1998).

Sin embargo, en un estudio realizado en la colonia de Xochimilco en Ciudad de México, se encontró, al igual que en Borbón, un promedio bajo de *E.coli* que correspondió al 35% del total de indicadores fecales identificados (Juárez et al, 2001).

### **7.3. Recuento de *Enterococcus* en el medio mEI(Difco®)**

De acuerdo al Gráfico # 30, podemos ver que los promedios de diez de las doce casas se encuentran muy cercanos al promedio general para todos los domicilios; sin embargo los valores de las viviendas 1 y 4 son elevados, lo que indica una gran concentración de *Enterococcus* en el agua de las mismas.

El conteo de *Enterococcus* en el medio mEI(Difco®) presenta las mismas dificultades que cuando se trata de determinar *E.coli* con los medios ml(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®); puesto que en el medio mEI(Difco®), crecen además de los *Enterococcus* otros microorganismos que no son de importancia en este estudio, éstos microorganismos tienen una coloración distinta a los *Enterococcus*, suelen ser rojos, rosados o incoloros (APHA, 1998).

En virtud de que el procedimiento de filtración de membrana para la identificación de *Enterococcus*, empleando el medio mEI(Difco®) es similar al de filtración de membrana para la identificación de *E.coli*, donde se utilizan los medios ml(Difco®) y m-cB(Millipore Corporation®); los posibles problemas que se establecieron para estos últimos casos podrían generarse también en la detección de *Enterococcus*.

Los *Enterococcus* fueron los indicadores que más se encontraron en las muestras de agua de Borbón (63%), sin embargo este porcentaje es elevado en comparación con los resultados obtenidos en investigaciones similares realizadas en el oriente ecuatoriano(26%), en comunidades indígenas de Chile(30,2%) y en la ciudad de México(23%)(Donoso, 2001; Castillo et al, 1998; Juárez et al, 2001). Una explicación puede ser que la gran presencia de *Enterococcus* en las muestras de agua de Borbón es un caso particular de esta población.

Es importante indicar, que el medio de cultivo para el aislamiento de *Enterococcus* que se empleó en la investigación realizada en México, fue el mismo que se utilizó para el estudio de Borbón, es decir el medio mEI(Difco®)(Juárez et al,2001) sin embargo los resultados fueron distintos.

#### **7.4. Recuento de Colifagos**

Uno de los mayores problemas que se enfrentó con este procedimiento, fue el calentamiento de los tubos de agar, porque el agua que contenía la olla en la que se colocaban los mismos tardaba en hervir, razón por la que se añadió NaCl para elevar el punto de ebullición. En algunos casos se consiguió una reacción positiva y el agar se tornaba líquido, pero la mayoría de veces esto no sucedía o simplemente el agar no se disolvía en su totalidad, motivo por el cual se decidió calentar los tubos en un horno microondas.

Otro de los problemas que se evidenció ocasionalmente con esta prueba, fue el crecimiento a gran escala de placas de colifagos, en especial en las casas 4, 7 y 8, lo cual pudo deberse a dos posibles razones: la primera a la marcada concentración de estos virus en el agua; y la otra, a una posible contaminación de la suspensión bacteriana de *E.coli* CN-13.

Conviene puntualizar que el ácido nalidíxico se debía agregar al tubo de agar cuando éste presentaba una temperatura ideal, es decir, ni muy caliente ni muy frío; puesto que de hacerlo cuando aún tiene una temperatura elevada, el ácido se desnaturaliza y los resultados varían; en cambio si se lo agrega cuando el agar se ha enfriado, el ácido nalidíxico (que tiene una temperatura baja porque se lo descongeló ese momento) puede congelar el agar y en ese caso el procedimiento debe repetirse. Para que el ácido nalidíxico pueda ser utilizado debe tener una temperatura semejante a la del ambiente, es decir ni caliente ni frío, caso contrario no se puede utilizar (Sobsey, 1995).

El porcentaje de colifagos que se obtuvo en este estudio (12%) fue el más bajo de los tres indicadores estudiados (*E.coli*, *Enterococcus*, colifagos); esto coincide con los resultados obtenidos del estudio realizado en dos poblaciones indígenas chilenas donde también se obtuvo un bajo promedio de colifagos (9,3%) (Castillo et al, 1998).

En la investigación realizada en Xochimilco, México, lo que más se encontró fue colifagos (42%)(Juárez et al, 2001), constituyéndose un caso especial y contrario a los resultados obtenidos en Borbón y en las comunidades mapuches chilenas.

## **7.5. Identificación de Organismos**

### **7.5.1. Identificación de *E.coli***

Tres de las colonias que resultaron negativas para *E.coli* con la prueba de Colilert también fueron negativas con Indol, por tal razón se confirma que éstas no eran colonias de *E.coli*, ya que con las dos pruebas realizadas se obtuvieron resultados negativos.

Por otro lado, dos colonias fueron negativas cuando se utilizó la prueba del Indol, pero con Colilert resultaron positivas, entonces se determinó que estas dos colonias eran coliformes totales, pero no *E.coli*.

La interpretación de estos resultados de identificación de *E.coli* puede variar de acuerdo a la vista del investigador, ya que la fluorescencia que se observa con la lámpara UV puede ser de mayor o menor intensidad; cuando es muy baja puede resultar difícil la percepción para el ojo humano. De la misma manera, el anillo rojo que se forma en la parte superior del tubo al añadir el reactivo de Kovac`s en la prueba del Indol, puede ser un rojo muy intenso o apenas visible, eso indica una mayor o menor concentración bacteriana. Al añadir un volumen pequeño del reactivo de Kovac`s, se tendría una dilución baja, la cual podría disminuir la concentración de indol por debajo de los niveles de sensibilidad de detección del reactivo (Koneman EW, 1992).

#### **7.5.2. Identificación de *Enterococcus***

En general las pruebas realizadas para verificar si una bacteria es *Enterococcus* resultaron eficaces y permitieron confirmar que la mayoría de colonias aisladas fueron tales.

De las siete pruebas que se hicieron a 24 colonias para comprobar si éstas son *Enterococcus*, veinte de estas colonias fueron positivas a todas las pruebas por lo tanto estas bacterias fueron identificadas como *Enterococcus*; tres de las cuatro bacterias restantes dieron resultado negativo al menos a una de las siete pruebas, por lo tanto esas colonias no fueron reconocidas como *Enterococcus* pero pertenecían a algún género relacionado con estos, finalmente la última colonia dio negativo a todas las pruebas y por esa razón no se trata de un *Enterococcus* (ver Tabla # 16).

Una de las posibles causas para que un escaso número de colonias analizadas den positivo en ciertas pruebas y negativo en otras, es su reducido tamaño, y quizás en estos casos no se logró tomar una cantidad representativa de las colonias como para obtener resultados más claros. La colonia que dio negativo a todas las pruebas, debió ser pequeña y de una bacteria que no era *Enterococcus*, pero que se encontraba próxima a uno de éstos.

## **7.6. Límites de Detección**

En esta prueba podemos ver que en los 3 ensayos que se realizaron, existió un orden descendente en cuanto al número de bacterias presentes en los Petrifilm(3M®), ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®) y mEI(Difco®), lo cual coincide con los resultados esperados, puesto que, mientras disminuye la concentración de la dilución lo obvio era encontrar una menor cantidad de bacterias; es decir, hay una correlación positiva entre el nivel de concentración y la cantidad de bacterias.

La ausencia casi total de *Enterococcus* en el medio mEI(Difco®) en las tres repeticiones realizadas, significa que esta bacteria se encuentra en cantidades muy pequeñas en las heces humanas utilizadas en este estudio. Estos datos no nos permiten formular una generalización definitiva debido a que se trabajó con muestras de heces de una sola persona; en tanto que para obtener resultados más certeros sobre la presencia de *Enterococcus* en la población, se requeriría de una muestra representativa.

Los resultados atípicos logrados en la prueba de colifagos en el primer ensayo, se debió a la contaminación de la caja petri, de la que se tomó *E.coli* CN-13 para preparar la suspensión bacteriana; por esta razón se preparó una nueva para los ensayos 2 y 3, extrayendo *E.coli* CN-13 de otras cajas, con el propósito de evitar una nueva contaminación.

## 8. Conclusiones

- Con los resultados obtenidos en las cinco pruebas efectuadas en esta investigación, se puede deducir que la más efectiva en la identificación de indicadores resultó ser la de *Enterococcus* (medio mEI(Difco®)); mientras que la prueba menos sensible fue la de Petrifilm(3M®). Los microorganismos que se identificaron en mayor cantidad fueron los *Enterococcus* y los que menos se encontraron fueron los colifagos.
- El promedio total de colonias de *E.coli* encontradas en los tres medios en este estudio fue de 179,05 por 100ml de agua, lo cual representa una cifra muy elevada. Si bien es cierto las muestras utilizadas en esta investigación no procedían de una fuente potable, la cantidad de colonias halladas fue sumamente alta y por tal razón esta agua no es apta para el consumo humano.
- El promedio de *Enterococcus* en toda la investigación fue de 343,38 por 100ml de muestra de agua, lo cual es una cifra muy alta por lo que el agua de ninguna de estas casas se puede considerar óptima para su consumo.
- La cantidad de colifagos encontrados en las muestras de agua fue muy inferior a la de bacterias detectadas en las mismas; así se puede ver que el promedio más alto de estos virus es de apenas 13,2 por 100ml de agua y que corresponde a la casa 7, mientras que el promedio más bajo se registró en el domicilio 3 y fue de 0,35 colifagos por 100ml de muestra.

- En la prueba de Colilert utilizada para la verificación de *E.coli* y coliformes totales, se obtuvo que el 98% de bacterias analizadas fueron coliformes totales y el 92,6% *E.coli*; por lo tanto, el procedimiento que se utilizó para el crecimiento de estos microorganismos se puede considerar confiable, ya que sus índices de crecimiento fueron muy altos.

- En la prueba del Indol, se encontró que el 90,7% de colonias analizadas fueron *E.coli*, lo cual representa un porcentaje elevado y cercano al que se obtuvo con Colilert que fue de 92,6%. Estos porcentajes confirman que los medios de aislamiento de esta bacteria utilizados en esta investigación son confiables.

- Del total de colonias que se aislaron del medio mEI(Difco®) para verificar si eran o no *Enterococcus*; el 83,33% dio positivo a todas las pruebas, lo que demuestra que esas bacterias eran *Enterococcus*. Este elevado porcentaje de resultados positivos, permite deducir, que el método de aislamiento de *Enterococcus* fue eficaz.

- En lo concerniente a la prueba de límites de detección se concluye que el método a través del cual se encontró una mayor cantidad de indicadores de contaminación fecal fue el medio ml(Difco®), puesto que se observó la presencia de éstos hasta en las diluciones menos concentradas; lo que evidencia el alto rango o grado de detección que presenta este medio en comparación con los otros empleados.

## **9. Recomendaciones**

- A partir de los resultados obtenidos en esta investigación es factible formular algunas sugerencias que conduzcan a mejorar la calidad del agua que consumen los pobladores de Borbón y, de esta manera reducir las enfermedades producidas como consecuencia del uso de agua contaminada en la alimentación y quehaceres

domésticos en general de las personas; así también como sugerir un método apropiado en la investigación de microorganismos indicadores de contaminación fecal.

- Para la investigación de microorganismos indicadores de contaminación fecal en muestras de agua sugiero que se realice la prueba de *Enterococcus*, utilizando el medio mEI(Difco®), debido a que esta prueba resultó ser la más sensible en este estudio.

- Es indispensable informar y capacitar a los habitantes sobre el nivel de riesgo que revisten las fuentes de agua en la transmisión de microorganismos que puedan alterar su salud, debiendo evitarse el consumo de agua de las fuentes que entrañan mayor peligro, por ejemplo del río, según la investigación realizada, por ser la menos confiable por múltiples razones: tiene una agitado tránsito de lanchas que salen y llegan hacia Borbón, debido a los desperdicios orgánicos e inorgánicos que son arrojados desde ellas.

- Organizar seminario – talleres de concientización sobre la realidad de los ríos Cayapas y Santiago, los mismos que antes de llegar a Borbón han recibido el agua de muchos afluentes y han atravesado varias poblaciones en las que han incrementado su contaminación debido a los desperdicios arrojados a ellos.

- Orientar y desarrollar la conciencia ambiental en los niños y adolescentes de Borbón, a través de sus centros educativos, con el propósito de que se constituyan en los protectores de la naturaleza y sus recursos, dentro de los cuales se encuentra el agua, elemento vital para la vida del ser humano.

- Promover el consumo de agua de la lluvia, por ser la fuente más limpia que se dispone en esta región.

- Se debe asesorar a la población sobre la necesidad de mantener los recipientes en los que acumulan el agua en óptimas condiciones de higiene, así como con la tapa respectiva con el propósito de evitar la contaminación.

- Es preciso capacitar a un grupo de personas de la población de Borbón o de su hospital para que periódicamente efectúen estudios y el correspondiente seguimiento sobre la calidad del agua, pudiendo emplearse el método de los Petrifilm(3M®); ya que este proceso es fácil, brinda resultados confiables, es económico y no requiere de un equipo sofisticado como los medios ml(Difco®), m-cB(Millipore Corporation®), mEI(Difco®) y colifagos.

- A través de las personas antes sugeridas, se debería orientar a los habitantes de la parroquia para que sometan el agua a un tratamiento casero, ya sea empleando cloro o hirviéndola, previo a su consumo.

- Demostrar a la población el valor e importancia que reviste el agua libre de contaminación para la vida del hombre; de esta manera se promoverá su motivación para que mediante la autogestión o el aporte de las autoridades pertinentes, se diseñe y construya una planta potabilizadora de agua que permita la solución definitiva al problema de salud detectado.

- En virtud de que, mediante la prueba de límites de detección se buscó determinar cuál de las cinco pruebas empleadas en el análisis de la calidad del agua de Borbón registraba mayor cantidad de microorganismos indicadores de contaminación fecal, para lo que se utilizó heces fecales de una persona; se sugiere que para ampliar esta investigación, lograr más datos y obtener conclusiones con un mayor nivel de generalización, se realice el análisis con muestras de heces de una población mayor, lo cual sería objeto de un trabajo posterior.

## 10. Bibliografía

- Aguilar, Eduardo. Ministerio de Salud Pública. Proceso de Control y Mejoramiento de la Salud Pública. Quito: Ministerio de Salud Pública. 2005.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, D.C.: Joint Task Group for Section 9224, 1997. Detection of Coliphages. For Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. 20<sup>th</sup> Edition Supplement (draft version – December 1997).
- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, D.C. : American Public Health Association. Segunda Edición. 1998.
- Bordner, R.J., Winter and P.V. Scarpino. 1978. Microbiological Methods for Monitoring the Environment, Water and Wastes, EPA -600/8-78- 017. Office of Research and Development, USEPA.
- Borrego, J.; Moriño, M.; De Vicente, A.; Córna, R. And Romero, P. 1987. “Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Its relationship with indicator and pathogenic microorganisms”. *Water Research.* 21, 1473-1480 pgs.
- Brenner, K.P., and C.C. Rankin, Y.R. Roybal, QN. Stelma, Jr., P.V. Scarpino, and A.P. Dufour. New Medium for the Simultaneous Detection of Total Coliforms and Escherichia coli in Water. *Applied and Environmental Microbiology* 59. 1993. 3534, 3544pgs.
- Cabelli, y. J., A. P. Dufour, M. A. Levin, L. J. McCabe, and P. W. Haberman, 1979. Relationship of Microbial Indicators to Health Effects at Marine Bathing Beaches. *Ainer. Jour. Fubiic Heaith* 69. 1979. 690-696 pgs.
- Castillo, Gabriela. Control de la calidad del agua a nivel comunitario. Santiago: Universidad de Chile, TRAFKIN. 1998. 3-7pgs.

- Chang, Raymond. Química. México D.F.: McGraw –Hill. Sexta Edición. 1999. 134pg.
  
- Covert, T.C., Sahdix, L.C., Rice, E.W., Haines, J.R., and Feyberg, R.W. (1989) Evaluation of the autoanalysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. Applied and Environmental Microbiology 55, 2433-2477 pgs.
  
- Donoso, Maria Eugenia. Aislamiento e identificación de bacterias de aguas de la región nororiental ecuatoriana. Quito: UCE, Facultad de Ciencias Químicas. 2001, 23-25, 37 pgs
  
- Eisenberg, Joseph. Estudio del Área del Cantón Eloy Alfaro. Quito: Ecodess. 56, 57 pgs.
  
- Environmental Protection Agency. Method 1600: Enterococci in Water by Membrane Filtration Using membrane-Enterococcus Indoxyl- $\beta$ -D-Glucoside Agar (mEI(Difco®)). Washington D.C. 2002. 12-13 pgs.
  
- Environmental Protection Agency. Test Methods for Escherichia coli and Enterococci in Water by the Membrane Filter Procedure. Washington D.C. 1985. 1,8-12, 13, 20, 21 pgs.
  
- Espejo, Romilio. Bacteriófagos. México D.F.: Secretaria General de la Organización de Estados Americanos. Segunda Edición. 1980. 4-5pgs.
  
- ETAPA. Calidad del agua de los ríos de las ciudad de Cuenca. Cuenca: ETAPA. 2004. 13, 17, 18, 21, 25, 28, 29 pgs.
  
- FDA. Bacteriological Analytical Manual. 8<sup>th</sup> ed., Revision A, Appendix 3.64.
  
- Feachem, Richard, Sanitation and Disease. Health Aspects of Excreta and Wastewater Management. Washington D.C. John Wiley & Sons. 1983.
  
- Freeman, Bob, Microbiología de Burrows. México D.F.: Interamericana McGraw-Hill. 22 Edición. 1989. 511-512pgs.

- Garzón, Guillermo. Fundamentos de Química General. Bogotá: Mc. Graw Hill. Segunda Edición. 1990. 195 pg.
  
- Gragow, W. Indicators systems for assessment of virological safety of treated drinking water. Wat. Sci. Tech. 18, 1986. 159-165pgs.
  
- Harrison, T.R. Principios de Medicina Interna. Madrid: Mc. Graw-Hill-Interamericana. Décima cuarta edición. 1998. 270, 271, 909, 1017, 1018 pgs.
  
- INEC. Anuario de Camas y Egresos Hospitalarios. #0031. Quito: Talleres Gráficos del INEC. Mayo 2005. 30pg.
  
- INEC. Anuario de Estadísticas Vitales. Nacimientos y Defunciones, 2004. #0076. Quito: Talleres Gráficos del INEC. Enero 2006. 214, 222 pgs.
  
- Juárez Luis. A, Silva Jesús., Uribe Felipe. J, Cifuentes Enrique. Microbiological indicators of water quality in the Xochimilco canals, Mexico City. México D.F.: Instituto Nacional de Salud Pública de México. 2001. 1-8pgs.
  
- Koneman EW. Allen SD, Janda WM, et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: JB Lippincott. Cuarta Edición. 39, 121, 133, 140, 145, 174, 175, 197, 293, 310, 311, 325, 341 pgs.
  
- Kott, Y.; Ben Ari, H. And Vinour, L. 1978. "Coliphages survival as viral indicator in various wastewater quality effluents". *Pro Wat Tech*. 10, 337-346 pgs.
  
- Levin, M. A., J. R. Fischer and V. J. Cabelli. Membrane Filter Technique for Enumeration of Enterococci in Marine Waters. *Appi. Microbiol.* 30: 1975. 66-71pgs.
  
- Mac. Faddin, Jean F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. Tercera Edición. 2003. 211 pg.
  
- Madigan, Michael T. Biología de los Microorganismos. Madrid: PEARSON Prentice Hall. Décima edición. 2004. 19, 238-241, 246, 841, 927, 928 pgs.

- Maier, Raina. Environmental Microbiology. Orlando: Academic Press. 2000. 494-496 pgs.
  
- Mara, Duncan. and Horan, Nigel. Handbook of Water and Wastewater Microbiology. London: Academic Press. 2003. 106pg.
  
- Mims, Cedric. Medical Microbiology. Londres: MOSBY. Tercera Edición. 2004. 133,134, 516, 517 pgs.
  
- Moe, C.L., Sobsey, M.D., Samsa, G.P. and Mesolo, V. Bacterial indicators of risk of diarrhoeal disease from drinking water in the Philippines. Bulletin of the World Health Organization. World Health Organization. 1991. 305-317 pgs.
  
- Myers, N. Tropical forests: The main deforestation fronts. Environmental Conservation 20. 1993. 9-16 pgs.
  
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. G. da Fonseca and J. Kent. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403. 2000. 853-858 pgs.
  
- Organización Panamericana de la Salud. Manual de Tratamiento de la Diarrea. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud. 1987. 1, 34, 35 pgs.
  
- Organización Panamericana de la Salud. La Salud en las Américas. Capítulo Ecuador Quito: Organización Panamericana de la Salud. 1998. 235-237 pgs.
  
- Paz y Miño. Indicadores de Contaminación Fecal en Aguas. Lima. 2003. 154-157pgs.
  
- Pepper, Ian., Charles P. Gerba. Environmental Microbiology, A Laboratory Manual. San Diego: ELSEVIER. Segunda Edición. 2004. 115,129 -135, 141 pgs.
  
- Prescott. Microbiología. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana. Quinta Edición. 2004. 704-707 pgs.

- Rodríguez, Rodolfo. Vademécum Académico de Medicamentos. México D.F.: Mc Graw Hill. Cuarta Edición. 2005. 26,27 pgs.
- Rubinson, Judith. Química Analítica Contemporánea. México D.F.: Pearson Educación. Primera Edición. 2000. 14-16pgs.
- Sobsey, M.D., Amanti, A., and Handzel, T. Detection and occurrence of coliphage indicator viruses in water: In Proceedings of the Water Quality Technology Conference. New Orleans, La: American Water Works Association. November 1995. 2087-2097pgs.
- Tamagnini, Lucía. González Rubén. Evaluation of two media and different plating techniques for enumeration of thermotolerant coliforms in river water. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 2001. 1-4pgs.
- Tortorelli, S. Environmental testing methods in your plant. 3M Micromessenger. 2000. 1,3pgs
- Wyngaarden, J.B. Tratado de Medicina Interna de Cecil. Madrid: Interamericana. Décimo sexta Edición. 1985. 706, 707 pgs.
- <http://www.sph.umich.edu/scr/ecodess/home.php>
- [www.millipore.com/catalogue.nsf/docs/M00PMCB24](http://www.millipore.com/catalogue.nsf/docs/M00PMCB24) - 40k
- <http://oh.water.usgs.gov/micro/ec1.html>
- <http://www.rapidmicrobiology.com/news/29h0.php>



## TABLAS

**Tabla # 1. Principales causas de morbilidad en 1999 (por 100,000 habitantes) en el cantón Eloy Alfaro**

<b>Enfermedad</b>	<b>Número de casos</b>
Infecciones respiratorias	1475
Parasitosis	700
Hipertensión	600
Malnutrición	450
<b>Diarrea</b>	450
Malaria	400
Enfermedades de la piel	250
Gastritis	250

(Eisenberg, 1999).

**Tabla # 2. Comparación de la incidencia de enfermedades (por 100,000 habitantes)**

	<b>Diarrea</b>	<b>Tifoidea</b>	<b>Salmonelosis</b>
<b>Eloy Alfaro</b>	2000	390	100
<b>Esmeraldas</b>	1600	160	120
<b>Ecuador</b>	1800	80	120

(Eisenberg, 1999).

**Tabla # 3. Agentes infecciosos que causan diarrea en niños**

<b>Mas importantes</b>	<b>Menos importantes</b>
<b>BACTERIAS</b>	<b>BACTERIAS</b>
<i>Shigellae</i> sp	<i>Salmonellae</i> sp
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica(ECET)	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (ECEP)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica(ECEH)	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora(ECEI)
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Pleisomonas shigelloides</i>
	<i>Vibrio cholerae</i>
<b>VIRUS</b>	<b>VIRUS</b>
Rotavirus	Virus de 27 nm(virus pequeños)
Adenovirus atípicos	Astrovirus, calicivirus

<b>PROTOZOOS</b>	<b>PROTOZOOS</b>
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Cryptosporidium sp</i>	

(Organización Panamericana de la Salud, 1987).

**Tabla # 4.1 Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a la casa # 1. Además el promedio total de *E.coli* para esta casa**

Muestra	Fecha	Petrifilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)	$\mu$ <i>E. coli</i> (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Colifagos (# placas)
1 A	02/02/06	0	60	20	27	1270	67
1 B	02/02/06	0	40	60	33	1550	0
1 fuente	02/02/06	0	10	110	40	3000	0
1 A	10/02/06	1700	1350	1280	1443	720	467
1 B	10/02/06	300	0	incontable		720	133
1 fuente	10/02/06	600	1440	1160	1067	1800	0
1 A	22/02/06	0	42	64	35	672	133
1 B	22/02/06	0	4	4	2,7	80	0
1 A	05/03/06	33	24	48	35	752	0
1 B	05/03/06	33	22	38	31	66	0
1 A	11/03/06	33	28	34	32	760	0
1 B	11/03/06	300	280	166	249	106	733
1 fuente	11/03/06	0	0	0	0	214	0

**Tabla # 4.2 Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a la casa # 2. Además el promedio total de *E.coli* para esta casa**

Muestra	Fecha	Petrifilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)	$\mu$ <i>E. coli</i> (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Colifagos (# placas)
2 A	10/02/06	0	0	10	3,33	90	0
2 B	10/02/06	0	0	10	3,33	300	0
2 fuente	10/02/06	0	40	20	20	340	433
2 A	21/02/06	0	0	0	0	500	0
2 B	21/02/06	0	0	0	0	230	100
2 fuente	21/02/06	0	0	0	0	1670	200
2 A	24/02/06	0	0	2	0,7	20	67
2 B	24/02/06	0	2	0	0,7	46	2067
2 fuente	24/02/06	0	10	0	3,33	0	incontable
2 A	07/03/06	4100	incontable	incontable		790	0
2 B	07/03/06	0	40	210	83	10	33
2 A	11/03/06	0	24	6	10	44	0
2 B	11/03/06	0	36	6	14	234	0
2 fuente	11/03/06	0	16	4	6,7	30	0

**Tabla # 4.3 Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a la casa # 3. Además el promedio total de *E.coli* para esta casa**

Muestra	Fecha	Petrifilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)	$\mu$ <i>E. coli</i> (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Colifagos (# placas)
3 A	03/02/06	100	150	50	100	1810	0
3 fuente	03/02/06	300	140	60	167	140	0

3 A	10/02/06	300	250	210	253	180	0
3 B	10/02/06	100	40	20	53	420	167
3 fuente	10/02/06	0	150	150	100	0	0
3A	22/02/06	900	1520	560	993	1040	0
3 B	22/02/06	150	88	26	88	8	0
3 fuente	22/02/06	200	240	100	180	10	0
3 A	05/03/06	0	0	0	0	0	0
3 B	05/03/06	0	0	0	0	0	0
3 fuente	05/03/06	0	0	0	0	0	0
3 A	10/03/06	400	620	310	443	380	0
3 B	10/03/06	0	26	0	8,66	1710	0
3 fuente	10/03/06	0	0	0	0	0	0

**Tabla # 4.4 Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a la casa # 4. Además el promedio total de *E.coli* para esta casa**

Muestra	Fecha	Petrifilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)	$\mu$ <i>E. coli</i> (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Colifagos (# placas)
4 A	03/02/06	0	0	0	0	0	0
4 B	03/02/06	2700	3200	3120	3006	3330	0
4 fuente	03/02/06	1000	1920	1140	1353	1530	400
4 A	11/02/06	4800	incontable	incontable		2470	200

4 B	11/02/06	200	180	320	233	580	incontable
4 fuente	11/02/06	3000	incontable	incontable		960	333
4 A	18/02/06	0	550	360	303	280	467
4 B	18/02/06	300	280	250	<b>277</b>	240	1167
4 fuente	18/02/06	1300	1290	920	1170	1160	267
4 A	08/03/06	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable
4 B	08/03/06	0	260	260	173	30	200
4 fuente	08/03/06	incontable	incontable	incontable	incontable	2550	233

**Tabla # 4.5 Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a la casa # 5. Además el promedio total de *E.coli* para esta casa**

Muestra	Fecha	Petrifilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)	$\mu$ <i>E. coli</i> (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Colifagos (# placas)
5 A	03/02/06	0	0	0	0	0	0
5 B	03/02/06	0	30	10	13	230	0
5 fuente	03/02/06	0	70	50	40	320	0
5 A	11/02/06	5300	incontable	1680		1130	3133
5 B	11/02/06	0	0	0	0	0	0
5 A	17/02/06	0	60	30	30	190	0
5 B	17/02/06	0	20	0	6,7	10	33
5 fuente	17/02/06	0	80	30	37	50	0
5 A	23/02/06	300	410	420	377	250	0
5 B	23/02/06	0	10	0	3,33	100	0
5 fuente	23/02/06	0	10	10	6,7	30	0

**Tabla # 4.6 Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a la casa # 6. Además el promedio total de *E.coli* para esta casa**

Muestra	Fecha	Petrifilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)	$\mu$ <i>E. coli</i> (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Colifagos (# placas)
6 A	06/02/06	0	0	60	20	0	67
6 fuente	06/02/06	0	0	0	0	50	0
6 A	17/02/06	0	0	0	0	20	0
6 fuente	17/02/06	100	40	50	63	140	33
6 A	10/03/06	0	8	6	4,7	26	0
6 B	10/03/06	100	50	80	76,7	0	0
6 fuente	10/03/06	0	0	0	0	640	0

**Tabla # 4.7 Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a la casa # 7. Además el promedio total de *E.coli* para esta casa**

Muestra	Fecha	Petrifilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)	$\mu$ <i>E. coli</i> (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Colifagos (# placas)
7 A	06/02/06	0	0	0	0	62	33
7 B	06/02/06	0	0	0	0	118	33
7 A	23/02/06	0	2	0	0,7	204	267
7 B	23/02/06	0	2	2	1,3	88	33
7 A	04/03/06	0	6	2	2,7	122	633
7 B	04/03/06	0	4	6	3,33	148	1233
7 fuente	04/03/06	0	0	0	0	10	833
7 A	08/03/06	0	90	370	153	360	367
7 B	08/03/06	0	200	270	157	2080	400
7 fuente	08/03/06	0	0	0	0	10	567

**Tabla # 4.8 Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a la casa # 8. Además el promedio total de *E.coli* para esta casa**

Muestra	Fecha	Petrifilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)	$\mu$ <i>E. coli</i> (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Colifagos (# placas)
8 A	06/02/06	100	24	8	44	32	0
8 fuente	06/02/06	100	10	10	40	10	0
8 A	21/02/06	0	20	0	6,7	10	33
8 B	21/02/06	500	500	430	477	1310	200
8 fuente	21/02/06	200	240	90	177	80	200
8 A	04/03/06	0	0	0	0	0	700
8 B	04/03/06	0	0	0	0	0	933
8 fuente	04/03/06	0	0	0	0	40	733
8 A	08/03/06	400	350	190	313	510	333
8 B	08/03/06	0	10	10	6,7	30	433

**Tabla # 4.9 Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a la casa # 9. Además el promedio total de *E.coli* para esta casa**

Muestra	Fecha	Petrifilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)	$\mu$ <i>E. coli</i> (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Colifagos (# placas)
9 A	08/02/06	0	2	0	0,7	0	0
9 B	08/02/06	0	50	20	23	60	0
9 A	16/02/06	0	0	10	3,33	20	300
9 B	16/02/06	0	0	0	0	182	0
9 A	22/02/06	67	46	34	49	318	0
9 B	22/02/06	0	0	0	0	40	33
9 fuente	22/02/06	0	10	10	6,7	0	0
9 A	05/03/06	0	0	0	0	0	100

9 A	10/03/06	0	20	0	6,7	250	0
9 B	10/03/06	0	10	20	10	10	0

**Tabla # 4.10 Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a la casa # 10. Además el promedio total de *E.coli* para esta casa**

Muestra	Fecha	Petrifilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)	$\mu$ <i>E. coli</i> (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Colifagos (# placas)
10 A	09/02/2006	20	20	330	123	incontable	100
10 B	09/02/2006	10	10	40	20	290	0
10 fuente	09/02/2006	0	0	0	0	0	67
10 A	18/02/2006	33,33	2	4	13	4	0
10 B	18/02/2006	0	0	0	0	6	0
10 fuente	18/02/2006	0	0	0	0	8	0
10 A	23/02/2006	367	460	154	330	102	67
10 B	23/02/2006	0	0	0	0	0	0
10 fuente	23/02/2006	0	0	0	0	2	100
10 A	07/03/2006	267	200	144	204	246	0
10 B	07/03/2006	0	2	0	0,67	4	0
10 fuente	07/03/2006	0	0	0	0	2	0
10 A	12/03/2006	0	0	0	0	60	0
10 B	12/03/2006	0	320	10	110	380	0
10 fuente	12/03/2006	0	0	0	0	1110	33

**Tabla # 4.11 Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a la casa # 11. Además el promedio total de *E.coli* para esta casa**

Muestra	Fecha	Petrifilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)	$\mu$ <i>E. coli</i> (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Colifagos (# placas)
11 A	09/02/06	20	20	330	123	incontable	100
11 B	09/02/06	10	10	40	20	290	0
11 fuente	09/02/06	0	0	0	0	0	67
11 A	18/02/06	33,33	2	4	13	4	0
11 B	18/02/06	0	0	0	0	6	0
11 fuente	18/02/06	0	0	0	0	8	0
11 A	23/02/06	367	460	154	330	102	67
11 B	23/02/06	0	0	0	0	0	0
11 fuente	23/02/06	0	0	0	0	2	100
11 A	07/03/06	267	200	144	204	246	0
11 B	07/03/06	0	2	0	0,67	4	0
11 fuente	07/03/06	0	0	0	0	2	0
11 A	12/03/06	0	0	0	0	60	0
11 B	12/03/06	0	320	10	110	380	0
11 fuente	12/03/06	0	0	0	0	1110	33

**Tabla # 4.12 Resultados de las cinco pruebas: petrifilms, ml, m-cB, mEI y colifagos obtenidos de las muestras correspondientes a la casa Ecodess. Además el promedio total de *E.coli* para esta casa**

Muestra	Fecha	Petrifilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)	$\mu$ <i>E. coli</i> (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Colifagos (# placas)
---------	-------	---------------------------	-------------------	---------------------	-------------------------------------	--------------------	-------------------------

Ecodess 1	02/02/06	0	40	10	17	130	67
Ecodess 2	03/02/06	100	120	60	93	140	100
Ecodess 3	06/02/06	100	10	50	53	1030	0
Ecodess 4	08/02/06	0	2	6	2,7	250	0
Ecodess 5	09/02/06	0	10	90	33,33	10	0
Ecodess 6	11/02/06	0	0	0	0	0	0
Ecodess 7	16/02/06	0	0	10	33,33	0	0
Ecodess 8	22/02/06	0	190	20	70	50	0
Ecodess 9	23/02/06	0	50	0	17	0	167
Ecodess 10	24/02/06	0	20	20	13,3	40	1700
Ecodess 11	05/03/06	0	0	0	0	0	467
Ecodess 12	07/03/06	1200	1310	1050	1187	180	233
Ecodess 13	08/03/06	0	10	10	6,7	30	400
Ecodess 14	11/03/06	0	30	0	10	20	0
Ecodess 15	12/03/06	0	10	0	3,33	0	0

**Tabla # 5. Promedio de *E.coli* (UFC/100ml) por medio de cultivo en cada casa**

Casa	Petriefilms (UFC/100ml)	ml (UFC/100ml)	m-cB (UFC/100ml)
1	230,7	<b>253,8</b>	248,6
2	<b>292,85</b>	12,92	20,61
3	175	<b>230,28</b>	106,14
4	<b>1330</b>	960	796,25
5	<b>509,09</b>	69	202,72
6	<b>28,57</b>	14	28
7	0	30,4	<b>65</b>

8	<b>130</b>	115,4	73,8
9	6,7	<b>13,8</b>	9,4
10	46,48	<b>67,6</b>	45,46
11	10,03	2,8	<b>18,8</b>
Ecodess	93,33	<b>120,13</b>	88,4

\* Los números en negrilla representan el valor más alto para cada casa.

**Tabla # 6. Promedio y valores máximo y mínimo (UFC/100ml) de enterococos por casa**

<b>Casa</b>	<b>Valor Mayor (UFC/100ml)</b>	<b>Valor Menor (UFC/100ml)</b>	<b>Promedio (UFC/100ml)</b>
1	3000	66	900,7
2	1670	0	307,42
3	1810	0	407
4	<b>3330</b>	0	<b>1193,63</b>
5	1130	0	210
6	640	0	125,14
7	2080	10	320,2
8	1310	0	202,2
9	318	0	88
10	1110	0	158,14

11	372	0	82,8
Ecodess	1030	0	125,33
<b>Promedio General</b>			<b>343,38</b>

\* Los valores en negrilla corresponden a los valores más altos.

**Tabla # 7. Promedio de Colifagos (# de placas) por casa**

Casa	$\mu$
1	117,92
2	223,07
3	11,92
4	233,33
5	287,81
6	14,28
7	439,9
8	356,5
9	43,3
10	24,46
11	56,6
Ecodess	208,93
$\mu$ colifagos:	168,16
$\Sigma$ colifagos:	2018,02

**Tabla # 8. Número de casos negativos por medio de cultivo**

Medio	Nº casos negativos
m-cB	53
mEI	25

ml	48
petrifilms	95
TSA.NA.	77

**Tabla # 9. Análisis estadístico de los casos positivos por medio de cultivo**

<b>Medio</b>	<b>Nº casos positivos</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Error Estándar</b>
m-cB	82	25,988	46,661	5,153
ml	87	29,747	55,973	6,001
petrifilms	44	8,159	12,568	1,895
mEI	114	61,886	82,424	7,72
TSA.NA.	61	11,607	16,107	2,062

**Tabla # 10. Análisis estadístico de todos los datos por medio de cultivo**

<b>Medio</b>	<b>Total de casos</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Error Estándar</b>
m-cB	135	15,785	38,449	3,309
ml	135	19,17	47,063	4,051
petrifilms	139	2,583	7,983	0,677
mEI	139	50,755	78,307	6,642
TSA.NA.	138	5,13	12,128	1,032

**Tabla # 11. Comparación de los medios de cultivo, utilizando los resultados de los casos positivos**

<b>Comparación entre medios</b>	<b>Diferencia de medias</b>	<b>Valor crítico</b>	<b>Valor - P</b>
m-cB, mEI	-35,898	16,172	< 0,0001
m-cB, ml	-3,759	17,19	0,6674
m-cB, petrifilms	17,829	20,872	0,0939
m-cB, TSA.NA.	14,381	18,884	0,1351
mEI, ml	32,139	15,9	< 0,0001
mEI, petrifilms	53,727	19,822	< 0,0001
mEI, TSA.NA.	50,279	17,718	< 0,0001
ml, petrifilms	21,588	20,661	0,0406
ml, TSA.NA.	18,141	18,651	0,0566
petrifilms, TSA.NA.	-3,447	22,091	0,7591

- Cuando el valor P es menor a 0,05 quiere decir que hay diferencia significativa entre los dos medios

**Tabla # 12. Comparación de los medios de cultivo, utilizando los resultados totales**

<b>Comparación entre medios</b>	<b>Diferencia de medias</b>	<b>Valor crítico</b>	<b>Valor - P</b>
m-cB, mEI	-34,97	10,642	< 0,0001
m-cB, ml	-3,385	10,719	0,5354

m-cB, petrifilms	13,302	10,642	0,0151
m-cB, TSA.NA.	10,655	10,661	0,0501
mEI, ml	31,585	10,642	< 0,0001
mEI, petrifilms	48,173	10,564	< 0,0001
mEI, TSA.NA.	45,625	10,583	< 0,0001
ml, petrifilms	16,588	10,642	0,0023
ml, TSA.NA.	14,04	10,661	0,0099
petrifilms, TSA.NA.	-2,548	10,583	0,6366

- Cuando el valor P es menor a 0,05 quiere decir que hay diferencia significativa entre los dos medios

**Tabla # 13. Comparación de los microorganismos indicadores encontrados, utilizando los resultados de los casos positivos**

Comparación entre Indicadores	Diferencia de medias	Valor crítico	Valor - P
Colifagos, <i>E.coli</i>	-12,234	16,269	0,1401
Colifagos, <i>Enterococcus</i>	-50,279	17,773	<0,0001
<i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	-38,046	13,001	<0,0001

- Cuando el valor P es menor a 0,05 quiere decir que hay diferencia significativa entre los dos medios

**Tabla # 14. Comparación de los microorganismos indicadores encontrados, utilizando los resultados totales**

Comparación entre Indicadores	Diferencia de medias	Valor crítico	Valor - P
-------------------------------	----------------------	---------------	-----------

<b>Colifagos, <i>E.coli</i></b>	-7,285	8,724	0,1015
<b>Colifagos, <i>Enterococcus</i></b>	-45,625	10,649	<0,0001
<b><i>E.coli</i>, <i>Enterococcus</i></b>	-38,34	8,7	<0,0001

- Cuando el valor P es menor a 0,05 quiere decir que hay diferencia significativa entre los dos medios

**Tabla # 15. Resultados de la verificación de *E.coli* en las pruebas de Colilert e Indol**

<b>Muestra</b>	<b>Medio de dónde se aisló</b>	<b>Colilert(amarillo)</b>	<b>Colilert(fluorescente)</b>	<b>Indol</b>
1 lluvia	petrifilm	positivo	positivo	Positivo
1 río(almacenada)	petrifilm	positivo	positivo	Positivo
2 río	petrifilm	positivo	positivo	Positivo
2 río	ml	positivo	positivo	Positivo
2 llave	ml	positivo	positivo	Positivo
1 río(almacenada)	ml	positivo	positivo	Positivo
1 río	ml	positivo	positivo	Positivo
1 río	m-cB	positivo	positivo	Positivo
1 río(almacenada)	m-cB	positivo	positivo	Positivo
2 llave	m-cB	positivo	positivo	Positivo
Río I	petrifilm	positivo	positivo	Positivo
Río II	petrifilm	positivo	positivo	Positivo
Río III	ml	positivo	positivo	Positivo
Río IV	ml	positivo	positivo	Positivo
3 llave	ml	positivo	positivo	Positivo
Ecodess llave	ml	positivo	positivo	Positivo
Río V	m-cB	positivo	positivo	positivo
3 llave	m-cB	positivo	positivo	positivo
4 llave I	m-cB	positivo	<b>negativo</b>	<b>negativo</b>

4 llave I	ml	positivo	positivo	positivo
4 llave II	ml	positivo	<b>negativo</b>	positivo
Ecodess llave I	ml	<b>negativo</b>	<b>negativo</b>	<b>negativo</b>
Ecodess llave II	ml	positivo	<b>negativo</b>	<b>negativo</b>
1 lluvia	petrifilm	positivo	positivo	positivo
1 río	petrifilm	positivo	positivo	positivo
Río I	petrifilm	positivo	positivo	positivo
Río II	petrifilm	positivo	positivo	<b>negativo</b>
Río III	petrifilm	positivo	positivo	positivo
5 llave	petrifilm	positivo	positivo	positivo
6 A	petrifilm	positivo	positivo	positivo
6 río	petrifilm	positivo	positivo	positivo
Río 6.40pm	petrifilm	positivo	positivo	<b>negativo</b>
1 lluvia	ml	positivo	positivo	positivo
1 río	ml	positivo	positivo	positivo
Río I	ml	positivo	positivo	positivo
Río II	ml	positivo	positivo	positivo
Río III	ml	positivo	positivo	positivo
5 llave	ml	positivo	positivo	positivo
6 A(tratamiento)	ml	positivo	positivo	positivo
6 B(sin tratamiento)	ml	positivo	positivo	positivo
6 río	ml	positivo	positivo	positivo
Ecodess A	ml	positivo	positivo	positivo
Ecodess B	ml	positivo	positivo	positivo
Río 6.40pm	ml	positivo	positivo	positivo
1 lluvia	m-cB	positivo	positivo	positivo
1 río	m-cB	positivo	positivo	positivo
Río I	m-cB	positivo	positivo	positivo
Río II	m-cB	positivo	positivo	positivo
Río III	m-cB	positivo	positivo	positivo



196 río	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	cocos
Ecodess A	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	cocos
Ecodess B	<b>negativo</b>	<b>negativo</b>	<b>negativo</b>	<b>negativo</b>	<b>negativo</b>	<b>negativo</b>		
Río 6:40pm	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	cocos

- Con negrilla se indican las pruebas que resultaron negativas.

**Tabla # 17. Resultados de la prueba de límites de detección: en la primera repetición**

# muestra	Petrifilms (UFC/100ml)	Volumen filtrado	ml (UFC/100ml)	m-CB (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Volumen	Colifagos (# placas)
Dilución 1	incontable	10ml	incontable	incontable	7	3ml	incontable
Dilución 2	incontable	10ml	incontable	25	0	3ml	80
Dilución 3	273	10ml	incontable	19	0	3ml	85
Dilución 4	62	10ml	320	14	0	3ml	93
Dilución 5	9	10ml	159	12	0	3ml	72
Dilución 6	1	10ml	50	1	0	3ml	45
Dilución 7	0	10ml	14	0	0	3ml	83
Dilución 8	0	10ml	0	0	0	3ml	80
Dilución 9	0	10ml	2	1	0	3ml	57
Dilución 10	0	10ml	23	0	0	3ml	90

**Tabla # 18. Resultados de la prueba de límites de detección: en la segunda repetición**

# muestra	Petrifilms (UFC/100ml)	Volumen filtrado	ml (UFC/100ml)	m-CB (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Volumen	Colifagos (#placas)
Dilución 1	incontable	10ml	incontable	incontable	0	3ml	0
Dilución 2	incontable	10ml	incontable	1	0	3ml	0

Dilución 3	46	10ml	211	7	0	3ml	0
Dilución 4	3	10ml	71	3	0	3ml	0
Dilución 5	7	10ml	11	1	0	3ml	0
Dilución 6	0	10ml	0	0	0	3ml	0
Dilución 7	0	10ml	5	0	0	3ml	0
Dilución 8	0	10ml	2	0	0	3ml	0
Dilución 9	0	10ml	0	0	0	3ml	0
Dilución 10	0	10ml	0	0	0	3ml	0

**Tabla # 19. Resultados de la prueba de límites de detección: en la tercera repetición**

# muestra	Petrifilms (UFC/100ml)	Volumen filtrado	ml (UFC/100ml)	m-CB (UFC/100ml)	mEI (UFC/100ml)	Volumen	Colifagos (#placas)
Dilución 1	incontable	10ml	incontable	incontable	0	3ml	incontable
Dilución 2	59	10ml	incontable	incontable	0	3ml	0
Dilución 3	14	10ml	116	163	0	3ml	0
Dilución 4	4	10ml	88	154	0	3ml	0
Dilución 5	0	10ml	78	4	0	3ml	0
Dilución 6	0	10ml	12	2	0	3ml	0
Dilución 7	2	10ml	20	12	0	3ml	0
Dilución 8	0	10ml	0	1	0	3ml	0
Dilución 9	0	10ml	1	0	0	3ml	0
Dilución 10	0	10ml	3	0	0	3ml	0

**Tabla # 20. Investigaciones semejantes realizadas en Ecuador y en otros países**

<b>Comunidades</b>	<b>Borbón</b>	<b>Cuenca</b>	<b>Saccha, Pucuna, Paraíso  Cuyabeno  Libertador</b>	<b>Córdoba</b>	<b>Maquehue,  Chol-Chol</b>	<b>Xochimilco  (Ciudad de México)</b>
<b>País</b>	<b>Ecuador</b>	<b>Ecuador</b>	<b>Ecuador</b>	<b>Argentina</b>	<b>Chile</b>	<b>México</b>
<b>Institución</b>	<b>ECODESS</b>	<b>ETAPA</b>	<b>UCE  Facultad de Ciencias Químicas</b>	<b>Universida d Nacional de Córdoba</b>	<b>Universidad de Chile - TRAFKIN</b>	<b>Instituto Nacional de Salud Pública</b>
<b>Año</b>	<b>2006</b>	<b>2004</b>	<b>2001</b>	<b>2001</b>	<b>1998</b>	<b>2001</b>
<b>Tipo de comunidad</b>	<b>Rural</b>	<b>Urbana</b>	<b>Rural</b>	<b>Urbana</b>	<b>Rural</b>	<b>Urbana</b>
<b>Fuente</b>	<b>Río  Pozo</b>	<b>Río</b>	<b>Estero  Pantanos</b>	<b>Río</b>	<b>Pozos  Chorrillos</b>	<b>Canales</b>

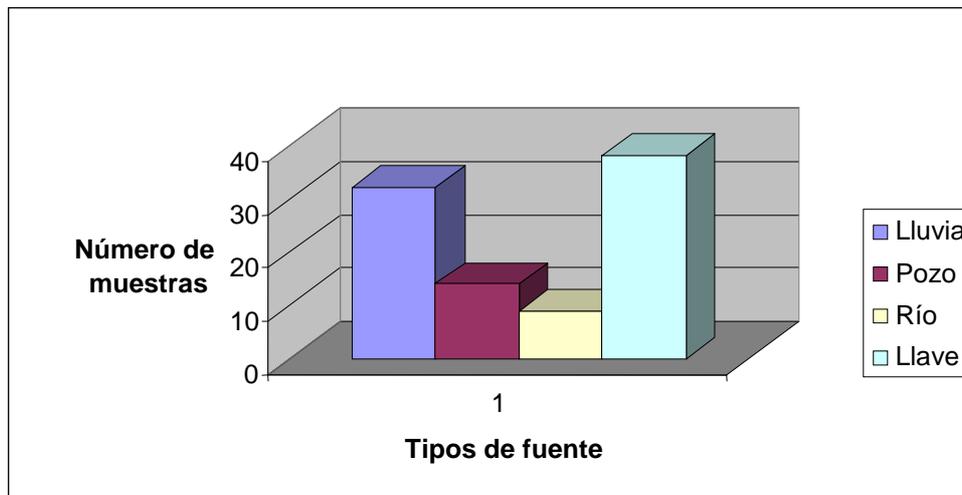
	Llave Lluvia Estero		Piscinas Lagunas Ríos		Esteros Ríos	
Método	Filtración de membrana. Doble agar	NMP	NMP	Filtración de Membrana. (m-Endo Agar LES)	Presencia/Ausencia (P/A), y tirilla de papel del H <sub>2</sub> S. Doble agar	Filtración de membrana. Doble agar

**Tabla # 21. Comparación de los resultados obtenidos en Borbón con otras investigaciones similares**

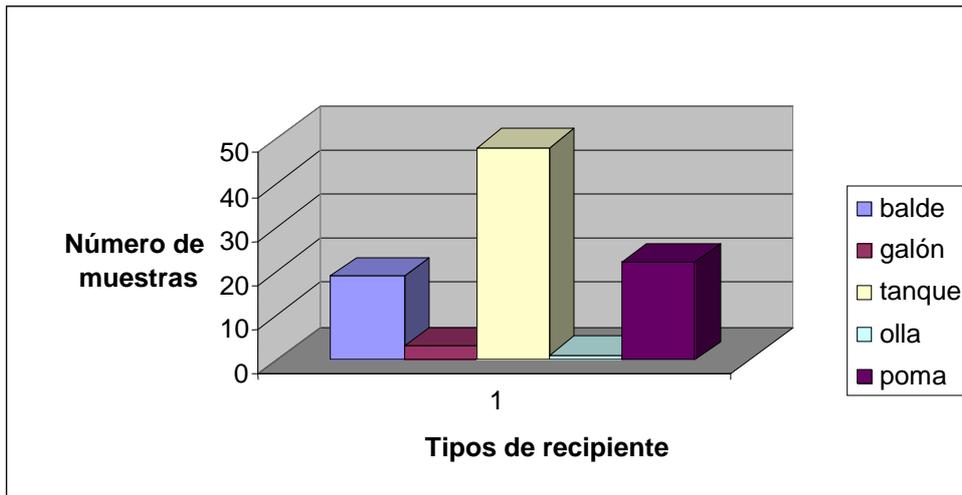
Comunidad	Borbón	Cuenca	Saccha, Pucuna, Paraíso Cuyabeno	Córdova (Argentina)	Maquehue, Chol-Chol (Chile)	Xochimilco (México)
-----------	--------	--------	---	------------------------	-----------------------------------	------------------------

Indicadores			Libertador			
<i>E. coli</i>	25%	<b>Tomebamba:12000 NMP/100ml</b>  <b>Yanuncay:2400 NMP/100ml</b>  <b>Tarqui:15000 NMP/100ml</b>  <b>Machángara:22000 NMP/100ml</b>  <b>Cuenca:72000 NMP/100ml</b>	74%	65%	60,5%	35%
<i>Enterococcus</i>	63%	-	26%	-	30,2%	23%
Colifagos	12%	-	-	-	9,3%	42%

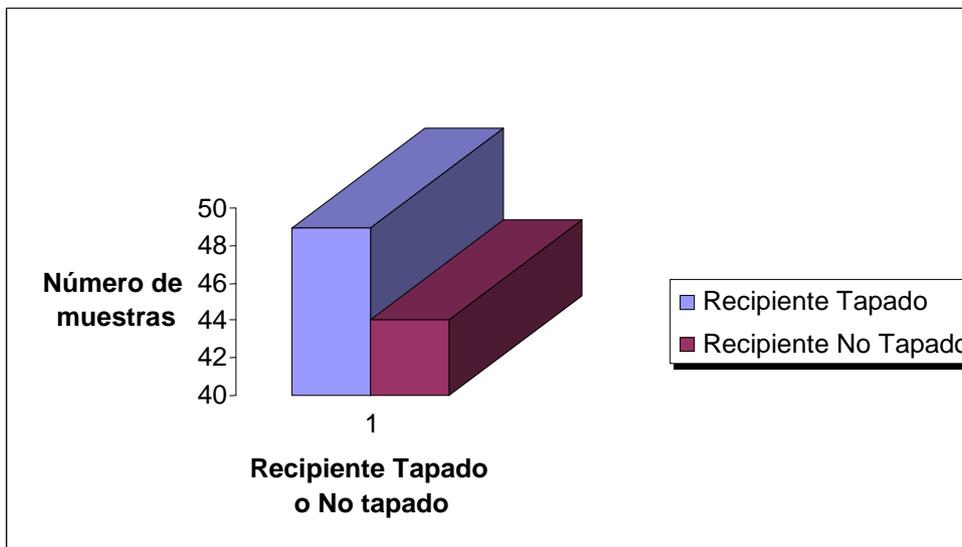
## GRAFICOS



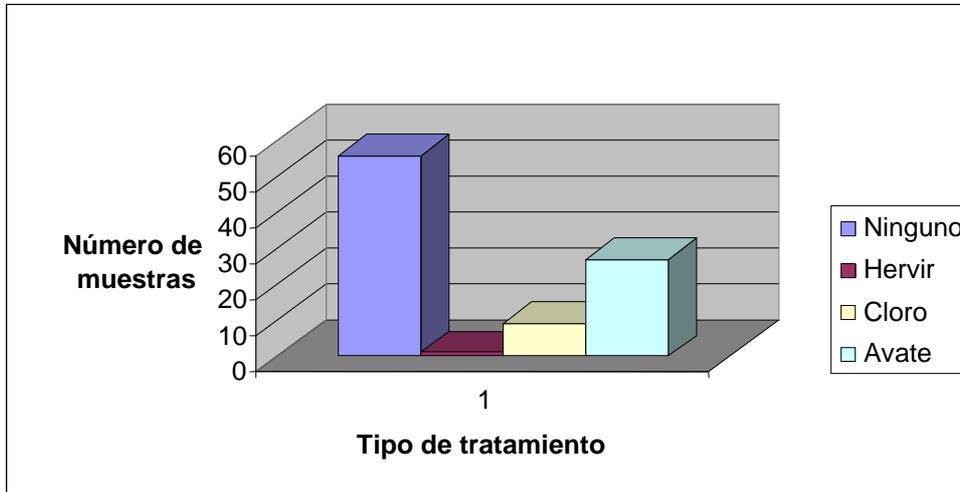
**Gráfico # 1. Tipos de fuente de donde se tomó las muestras de agua.**



**Gráfico # 2. Tipos de recipiente de donde se tomó las muestras**

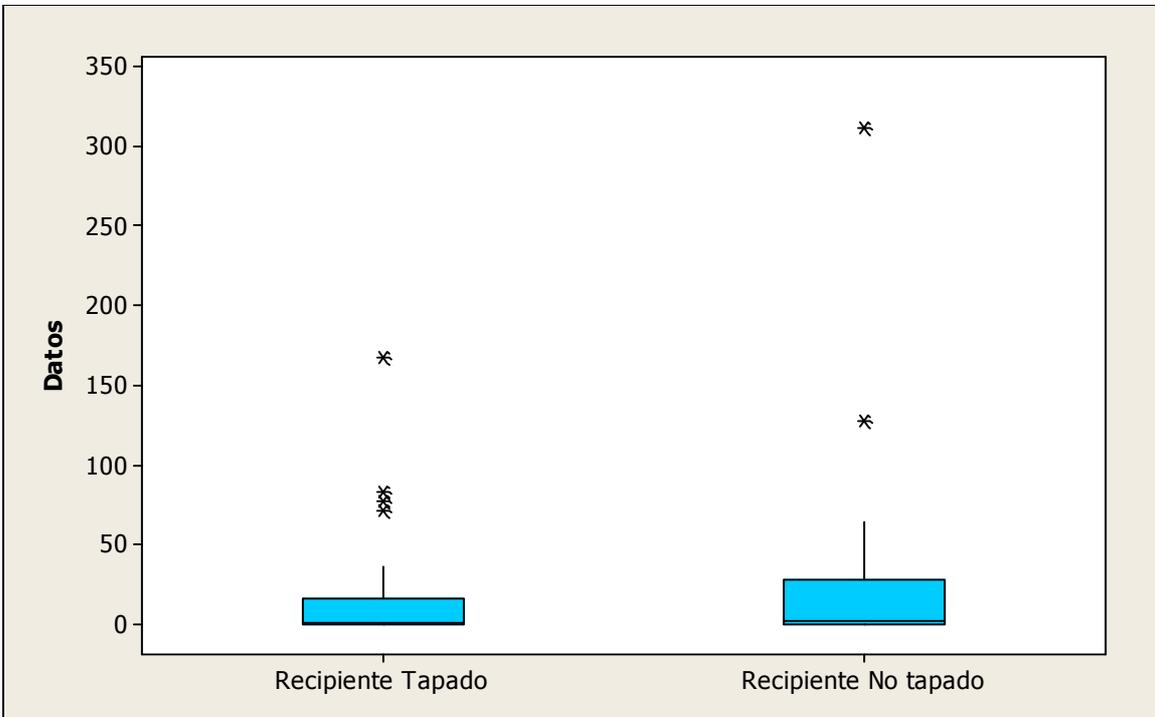


**Gráfico # 3. Recipientes tapados vs. recipientes no tapados**

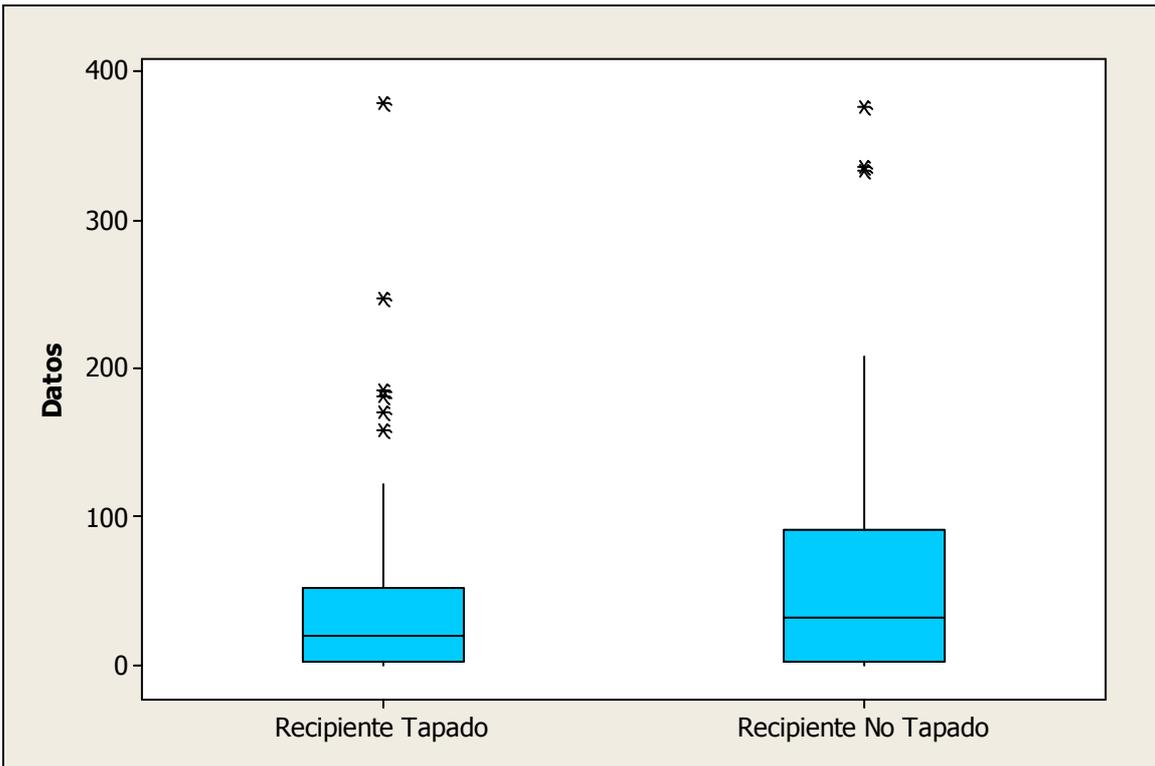


**Gráfico # 4. Tipo de tratamiento del agua que hacen los habitantes de Borbón dentro de sus casas.**

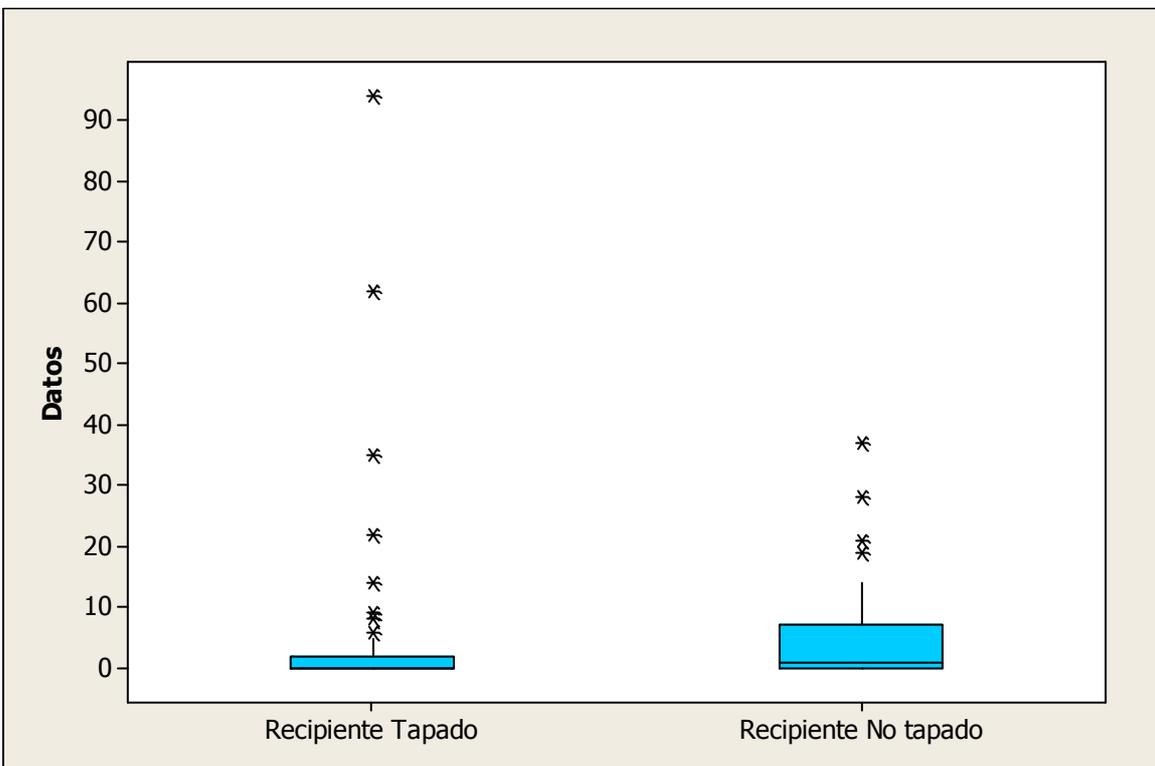




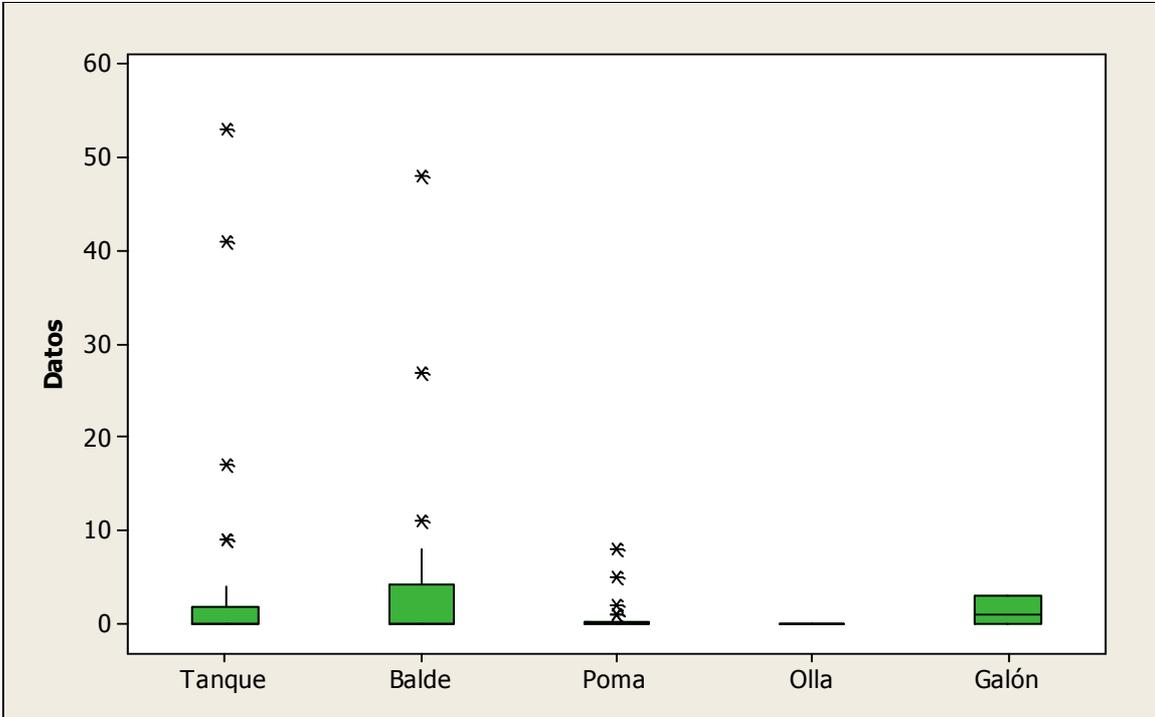
**Gráfico # 7. Diagrama de caja de las UFC encontradas en el medio m-cB. Las muestras fueron tomadas de recipientes tapados y recipientes no tapados**



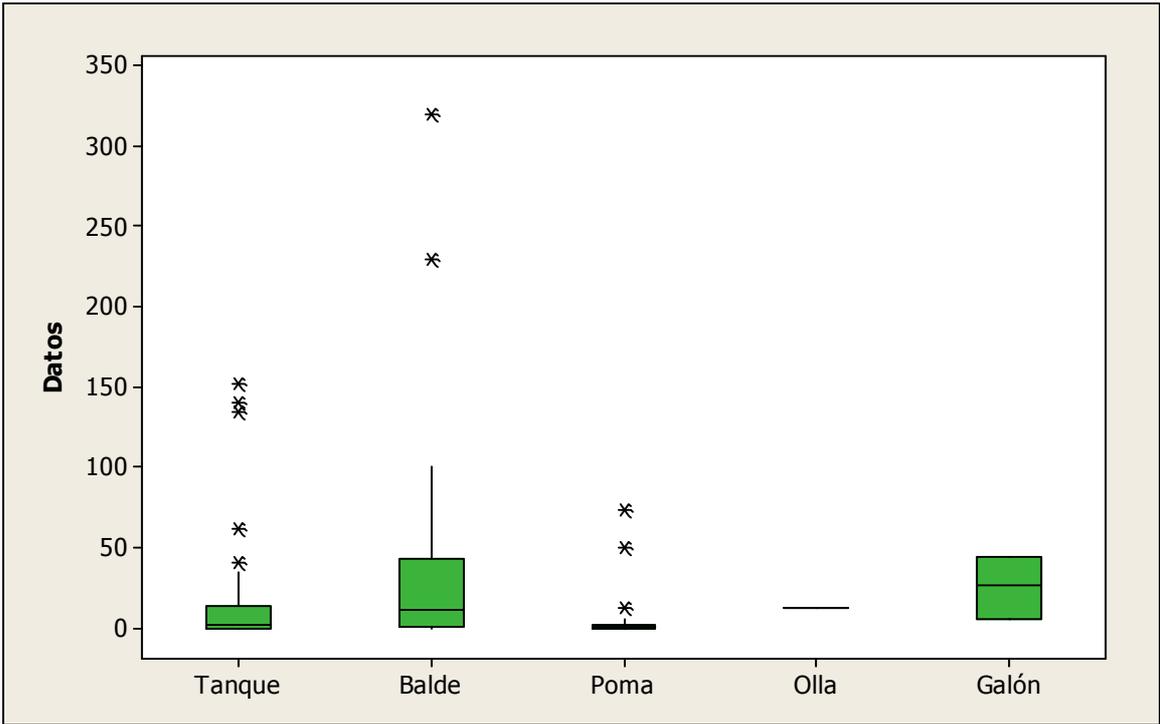
**Gráfico # 8. Diagrama de caja de las UFC encontradas en el medio mEI. Las muestras fueron tomadas de recipientes tapados y recipientes no tapados**



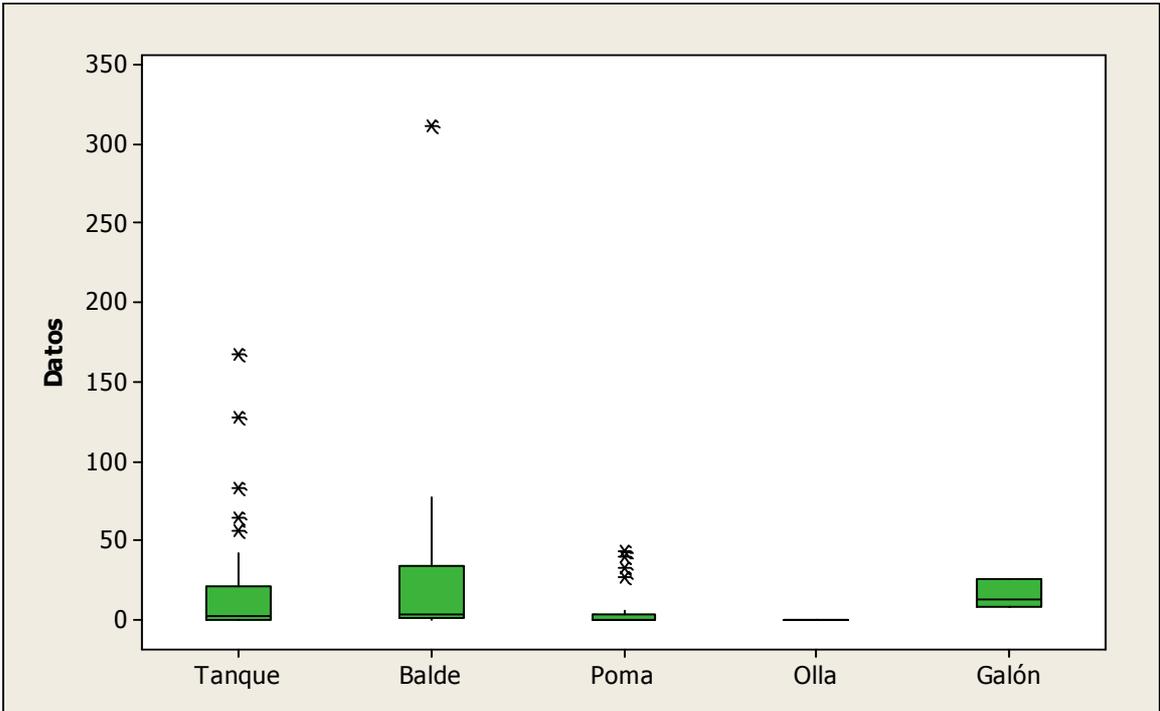
**Gráfico # 9. Diagrama de caja de las placas encontradas en el medio TSA.NA. Las muestras fueron tomadas de recipientes tapados y recipientes no tapados**



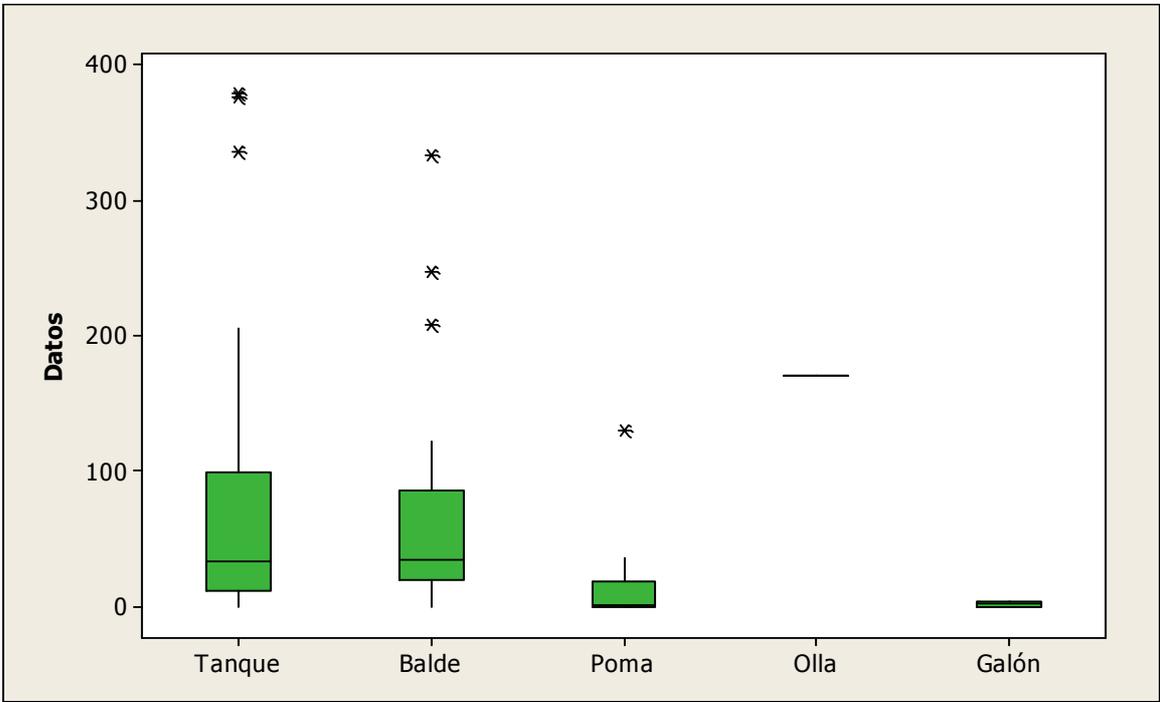
**Gráfico # 10. Diagrama de caja de los resultados obtenidos con las placas petrifilms, considerando el tipo de recipiente de donde se tomaron las muestras**



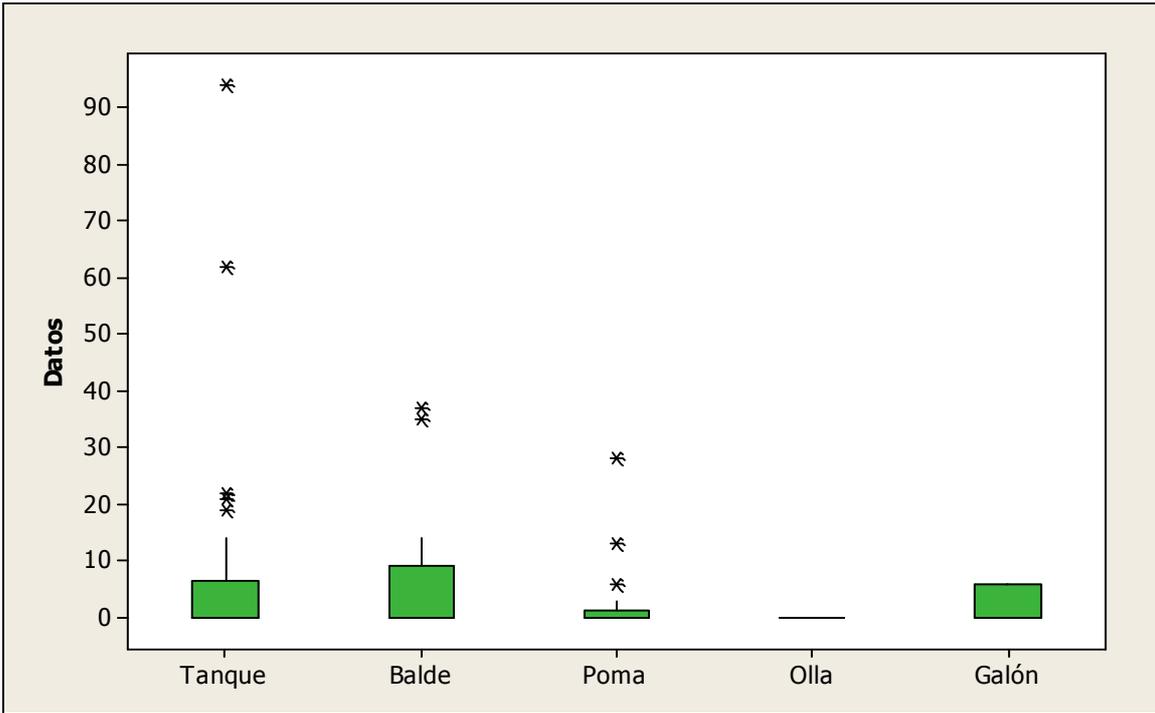
**Gráfico # 11. Diagrama de caja de los resultados obtenidos con el medio ml, considerando el tipo de recipiente de donde se tomaron las muestras**



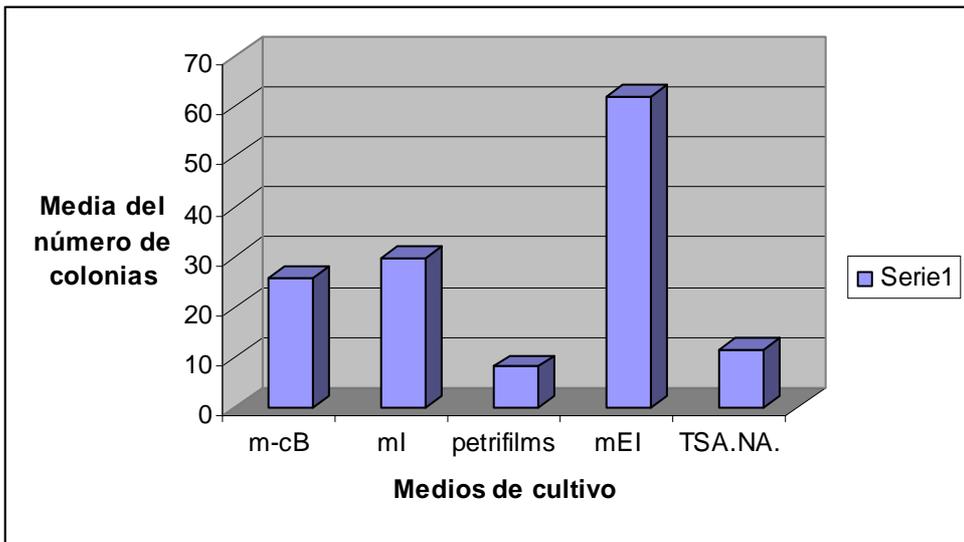
**Gráfico # 12. Diagrama de caja de los resultados obtenidos con el medio m-cB, considerando el tipo de recipiente de donde se tomaron las muestras**



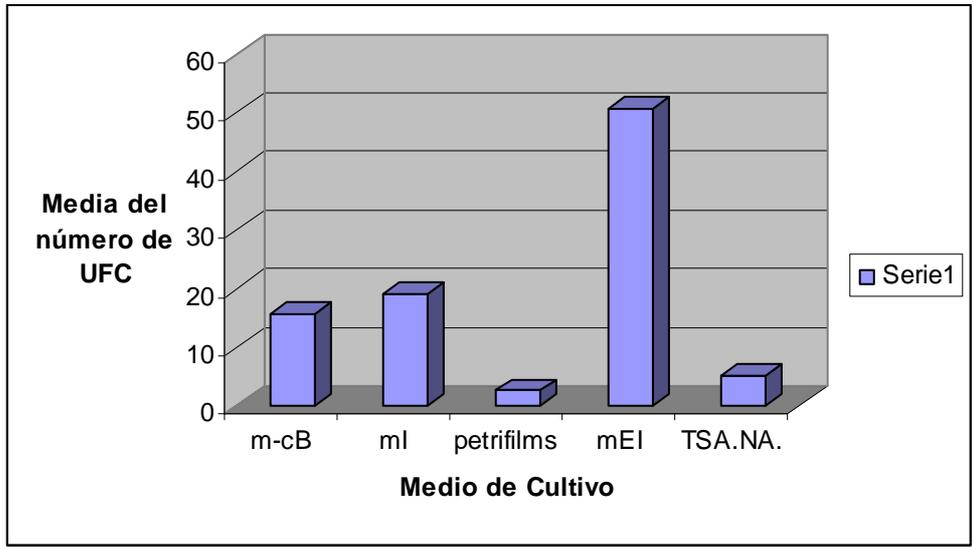
**Gráfico # 13. Diagrama de caja de los resultados obtenidos con el medio mEI, considerando el tipo de recipiente de donde se tomaron las muestras**



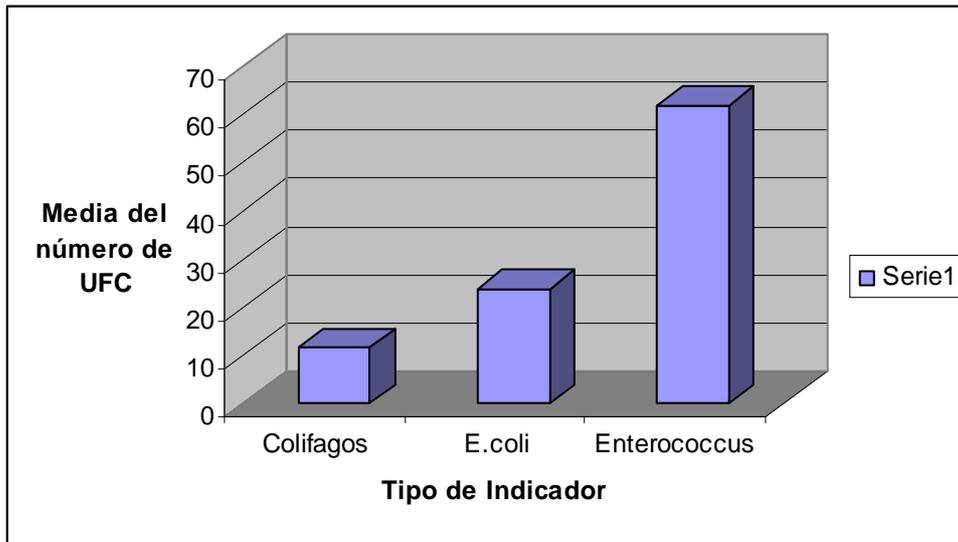
**Gráfico # 14. Diagrama de caja de los resultados obtenidos con el medio TSA.NA., considerando el tipo de recipiente de donde se tomaron las muestras**



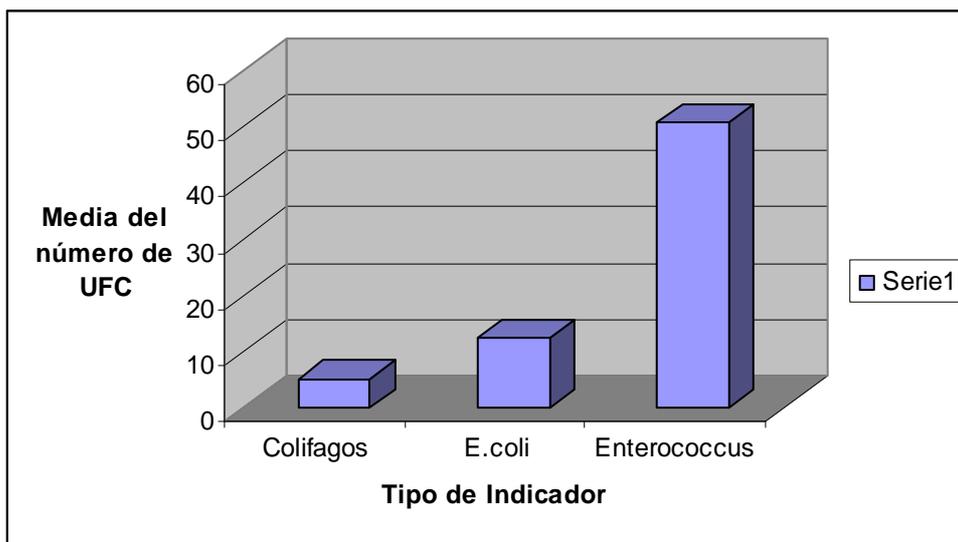
**Gráfico # 15. Comparación de las medias en los cinco medios de cultivo: petrifilms, ml, m-cB, mEI, TSA.NA. de los casos positivos**



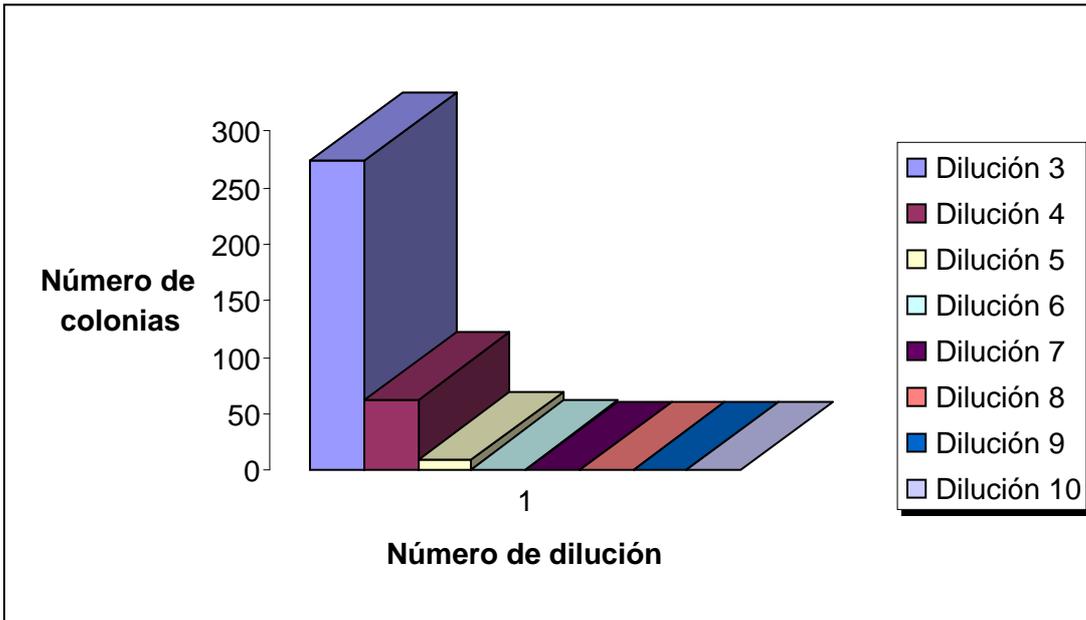
**Gráfico # 16. Comparación de las medias en los cinco medios de cultivo: petrífilm, ml, m-cB, mEI, TSA.NA de todos los datos**



**Gráfico # 17. Comparación de las medias de los microorganismos indicadores: *E.coli*, *Enterococcus* y Colifagos de los casos positivos**

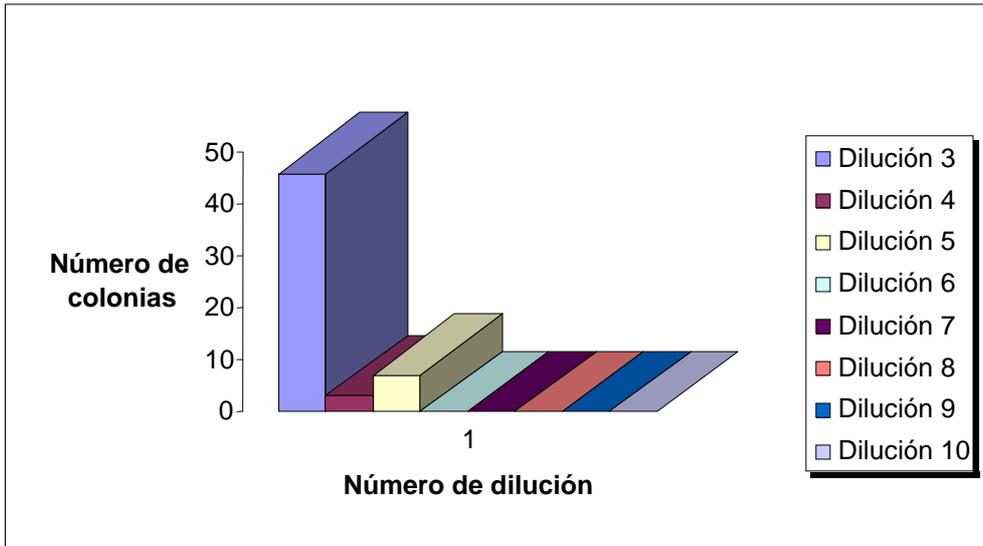


**Gráfico # 18. Comparación de las medias de los microorganismos indicadores: *E.coli*, *Enterococcus* y Colifagos de todos los casos**



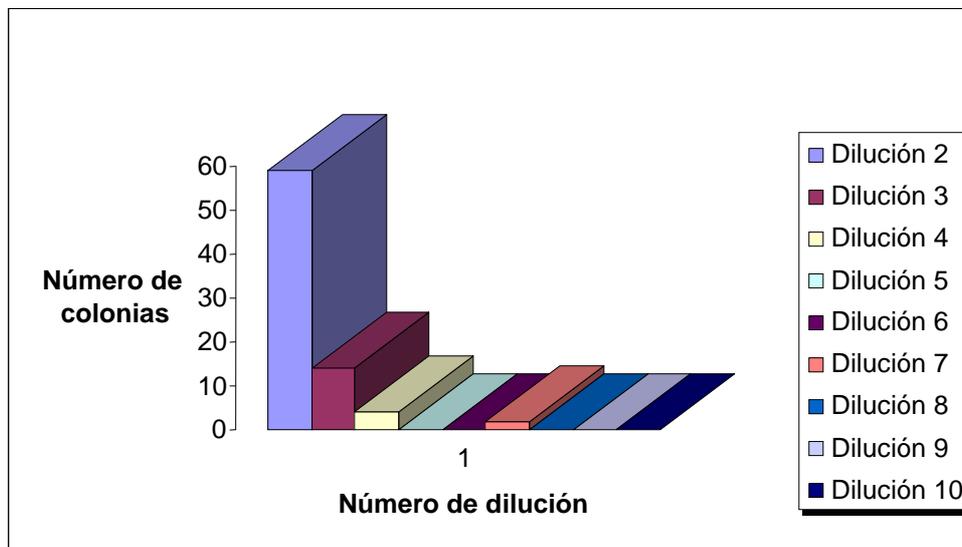
**Gráfico # 19. Crecimiento de *E.coli* en los petrifilms, día 1 (límites de detección)**

- No se tomó en cuenta las dos primeras diluciones, pues el número de colonias que en ellas crecieron fue incontable.



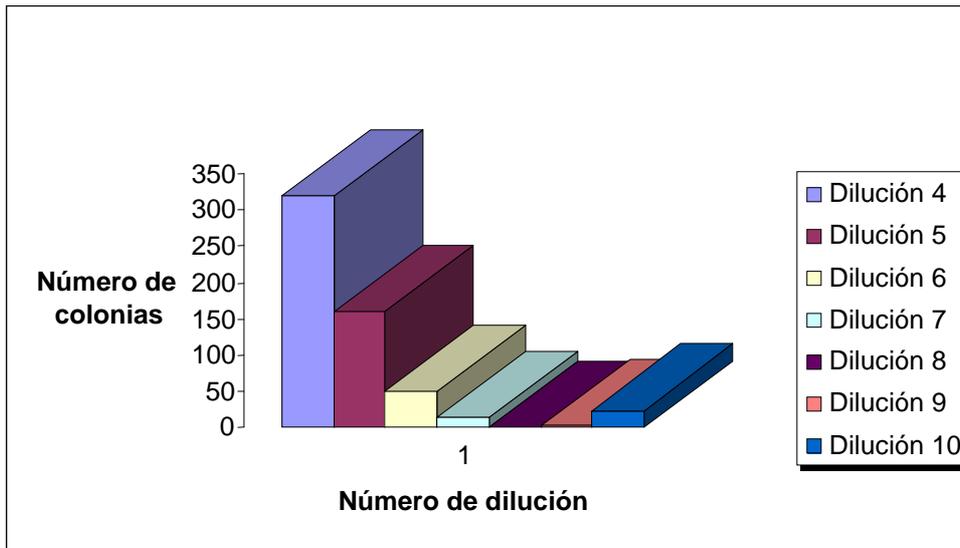
**Gráfico # 20. Crecimiento de *E.coli* en los petrifilms, día 2 (límites de detección)**

- No se tomó en cuenta las dos primeras diluciones, pues el número de colonias que en ellas crecieron fue incontable

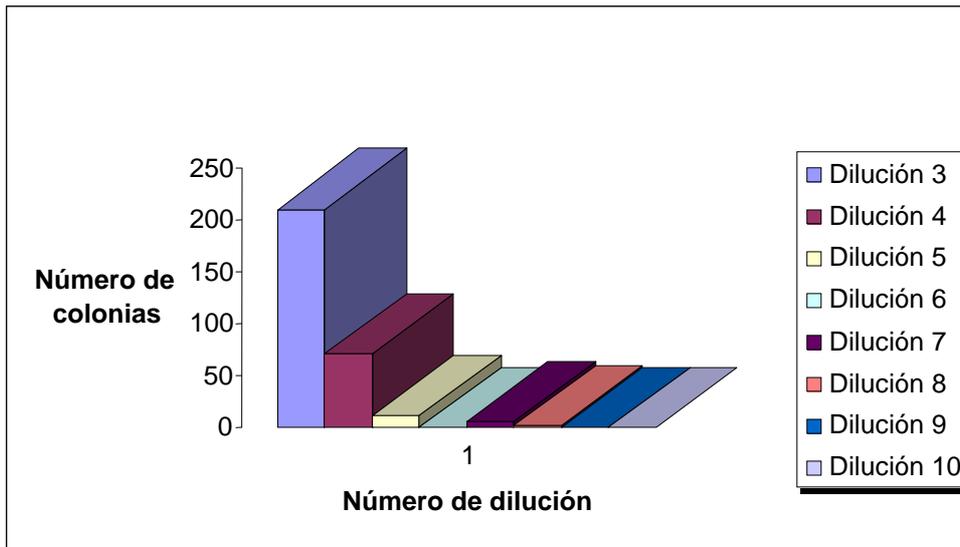


**Gráfico # 21. Crecimiento de *E.coli* en los petrifilms, día 3 (límites de detección)**

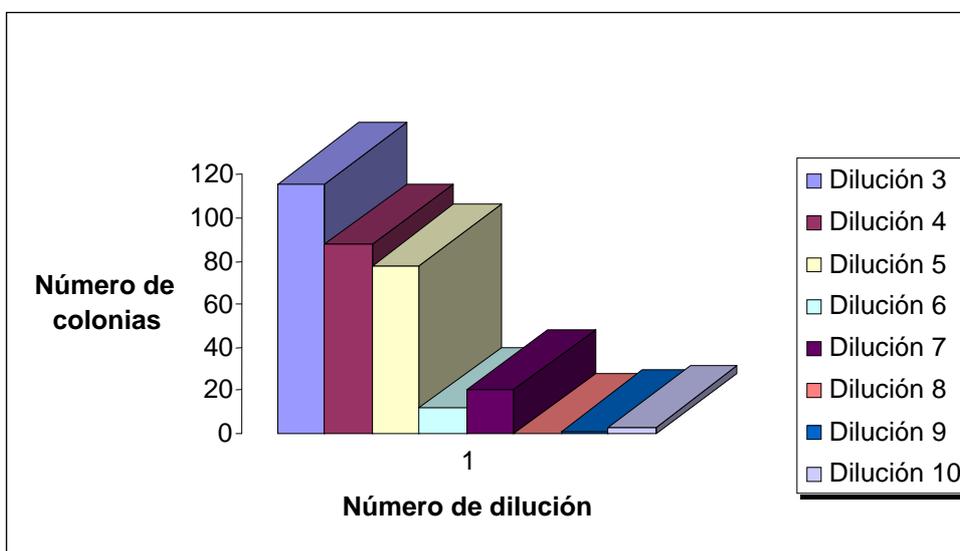
- No se tomó en cuenta la primera dilución, pues el número de colonias que en ella creció fue incontable



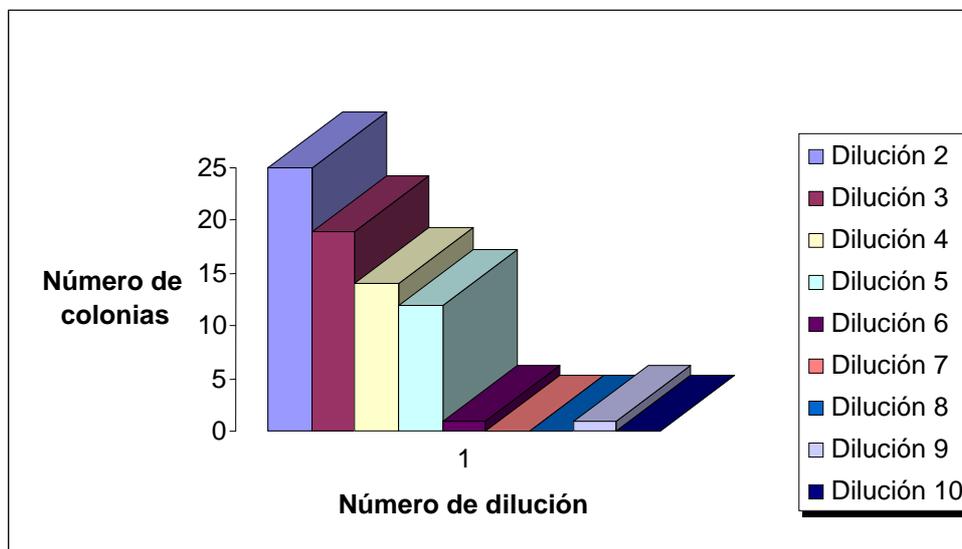
**Gráfico # 22. Crecimiento de *E.coli* en el medio ml, día 1 (límites de detección)**



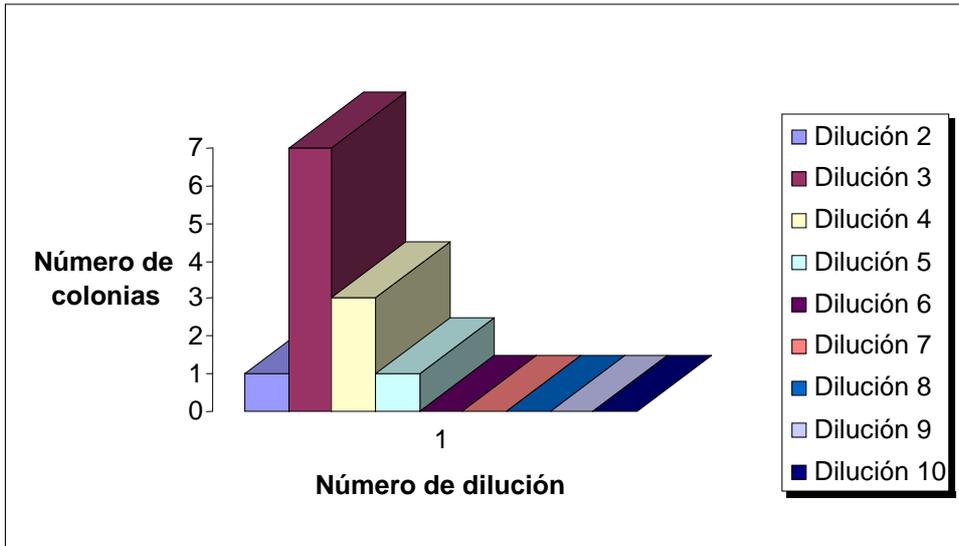
**Gráfico # 23. Crecimiento de *E.coli* en el medio ml, día 2 (límites de detección)**



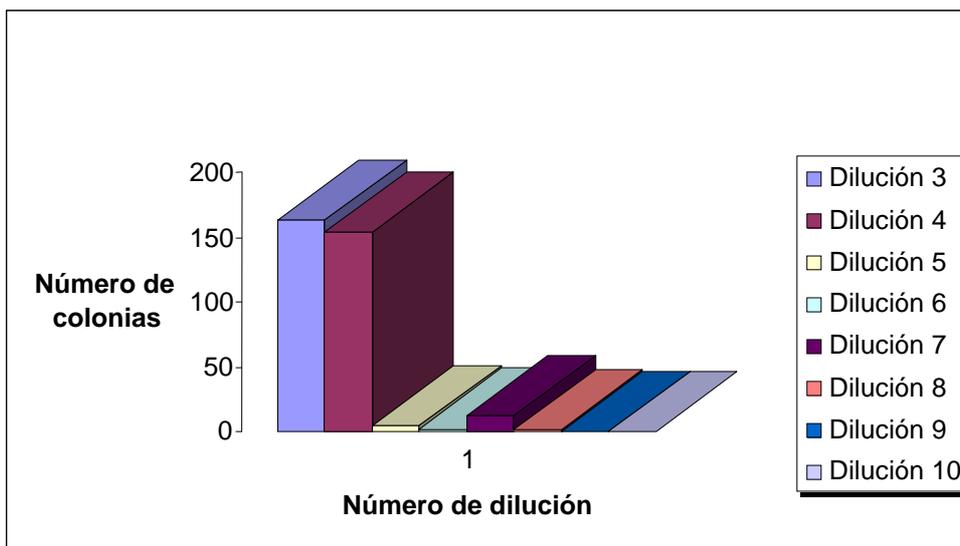
**Gráfico # 24. Crecimiento de *E.coli* en el medio ml, día 3 (límites de detección)**



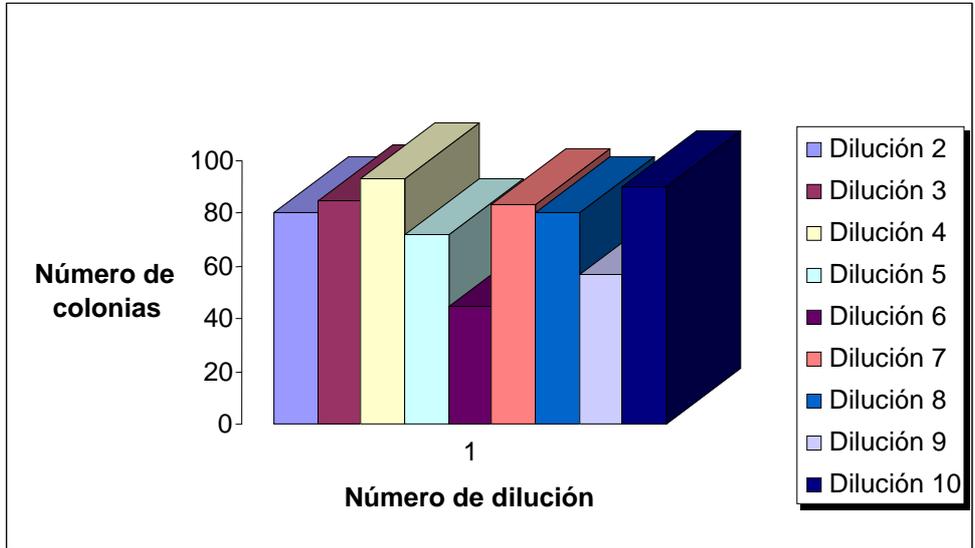
**Gráfico # 25. Crecimiento de *E.coli* en el medio m-cB, día 1 (límites de detección)**



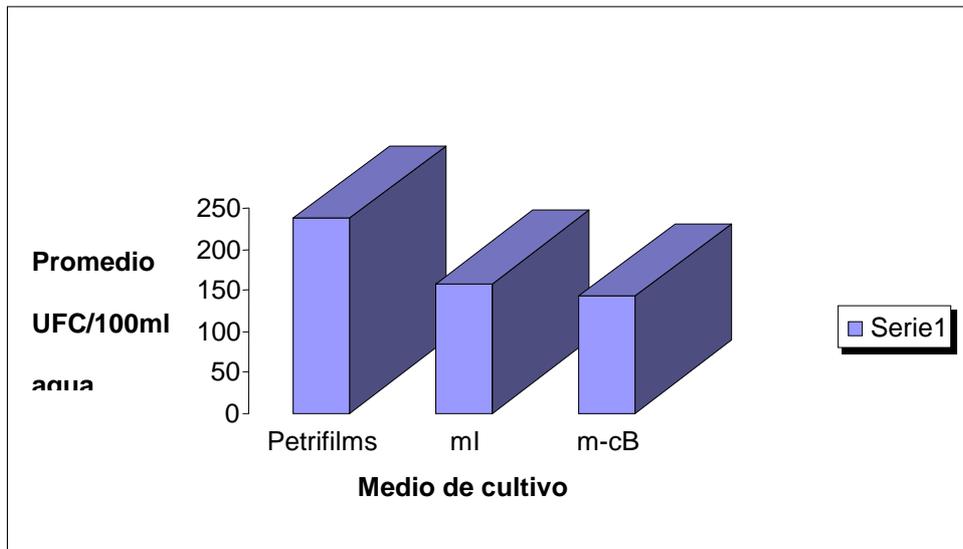
**Gráfico # 26. Crecimiento de *E.coli* en el medio m-cB, día 2 (límites de detección)**



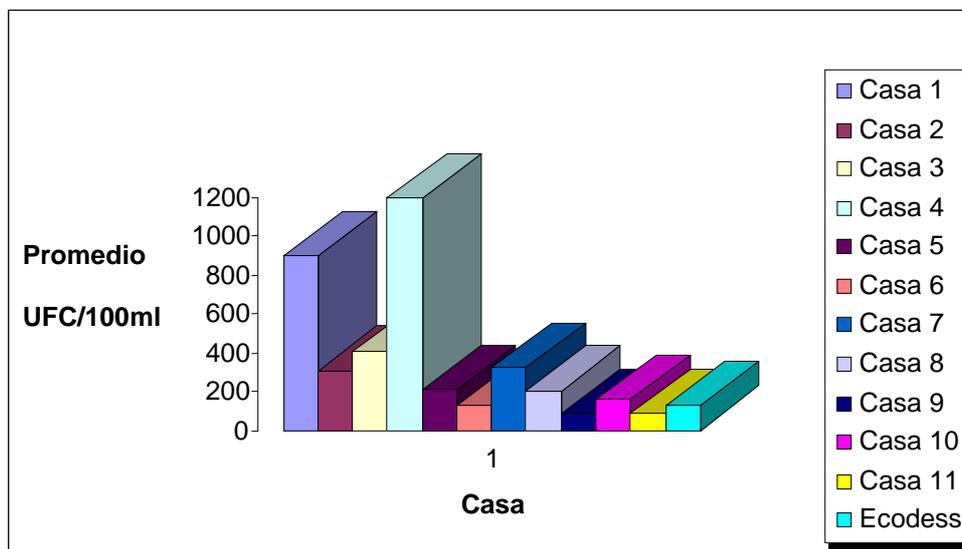
**Gráfico # 27. Crecimiento de *E.coli* en el medio m-cB, día 3 (límites de detección)**



**Gráfico # 28. Crecimiento de colifagos, día 1 (límites de detección)**



**Gráfico # 29. Promedio de la concentración de *E.coli* en cada medio de cultivo empleado**



**Gráfico # 30. Promedio del crecimiento de *Enterococcus* por casa**

## **ANEXO I**

### **PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS**

## **PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS**

### **PREPARACION DE PBS**

#### **Solución Común (10x):**

Mezclar los reactivos y poner en cilindro graduado de 1000ml:

5.8g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

25g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

85g NaCl

Añadir 800ml de agua destilada.

Disolver y medir el pH. Ajustar hasta que tenga un pH de  $7.4 \pm 0.2$ .

Añadir agua destilada hasta 1000ml.

Autoclavar.

#### **Solución de Trabajo (1x):**

Mezclar 50ml de solución común con 450ml agua destilada.

Autoclavar.

### **AGAR ml**

Para la preparación de este medio, primero se prepara la solución común de cefsulodin.

## **Preparación de la Solución Común de Cefsulodin**

Mezclar 0.02g de Cefsulodin en 20ml de agua destilada. Filtrar con una jeringuilla, utilizando un filtro estéril de 0,22um a un frasco también estéril.

## **Preparación del medio ml**

- Añadir 21.9g del agar ml a 600ml de agua destilada.
- Autoclavar.
- Enfriar aproximadamente a 50°C.
- Añadir 3ml de solución común de cefsulodin.
- Mezclar suavemente.
- Verter en las cajas petri.
- Dejar enfriar.
- Almacenar en la nevera a  $4^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{ C}$ .

[600ml produce aproximadamente 85 cajas].

### **AGAR mEI**

Antes de preparar este medio, se debe hacer la solución común de 2,3,5 Triphenyltetrazolium chloride y la solución común de ácido nalidíxico.

#### **Preparación de la Solución común de 2,3,5 Triphenyltetrazolium chloride**

Mezclar 0.1g de 2,3,5 Triphenyltetrazolium chloride en 10ml de agua destilada. Filtrar con una jeringuilla, utilizando un filtro estéril de 0,22um a un frasco también estéril.

Se debe hacer una mezcla fresca cada vez que se prepara el medio.

#### **Preparación de la Solución común de Acido Nalidíxico**

Mezclar 0.48g de Acido Nalidíxico en 10ml de agua destilada.

Disolver con NaOH.

Filtrar con una jeringuilla, utilizando un filtro estéril de 0,22um a un frasco también estéril.

Guardar en la nevera a  $-20^{\circ}\text{C}$ , caduca en un año. Esta solución de ácido nalidíxico se utiliza sólo para preparar el agar mEI.

## **Preparación del medio mEI**

- Añadir 43.2g mEI agar a 600ml de agua destilada.

- Autoclavar.
- Enfriar aproximadamente a 50°C.
- Añadir 3ml de solución común de ácido nalidíxico.
- Añadir 1.2ml de la solución común de 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride.
- Mezclar suavemente.
- Verter en las cajas petri.
- Dejar enfriar.
- Almacenar en la nevera a  $4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

[600ml produce aproximadamente 85 cajas].

### **TSB**

Colocar 30g de TSB por litro de agua, hacer la conversión respectiva para el volumen necesario. Autoclavar, dejar enfriar y repartir en tubos. Almacenar a

$4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  hasta usar.

### **Solución común de Acido Nalidíxico**

Mezclar 1g de ácido nalidíxico por 100ml de agua destilada, disolver con NaOH. Filtrar con una jeringuilla, utilizando un filtro estéril de 0,22um a un frasco también estéril. Guardar en la nevera a  $-20^{\circ}\text{C}$ , caduca en un año. Esta solución de ácido nalidíxico se utiliza exclusivamente para el proceso de colifagos.

### **1.5% TSA con Acido Nalidíxico (TSA N.A.)**

Agregar a un frasco Erlenmeyer de 1L:

- 18g de TSB
- 9g de agar
- 1,2 g de  $\text{MgSO}_4$

[Disolver primero el  $\text{MgSO}_4$  en un volumen determinado de agua destilada antes de añadir TSB y agar].

Una vez que se han colocado los tres reactivos en el Erlenmeyer, añadir 600ml de agua destilada y mezclar, luego autoclavar.

Enfriar aproximadamente a 50°C.

Agregar 6ml de solución común de Acido Nalidíxico para colifagos y mezclar suavemente.

Repartir en cajas petri.

Guardar en la nevera a  $4^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ .

[600ml produce aproximadamente de 22-30 cajas].

### **Tubos con 0.7% TSA**

Agregar a un frasco Erlenmeyer de 1L:

- 18g de TSB
- 4.2g de agar
- 1.2g de  $\text{MgSO}_4$

[Disolver primero el  $\text{MgSO}_4$  en un volumen determinado de agua destilada antes de añadir TSB y agar].

Una vez que se han colocado los tres reactivos en el Erlenmeyer, añadir 600ml de agua destilada y mezclar.

Calentar en el horno microondas hasta que el agar se disuelva completamente.

Repartir volúmenes de 7ml en tubos de 16X125mm.

Autoclavar los tubos.

[600ml produce aproximadamente 70 tubos].

### **Caldo corazón-cerebro (BHIB)**

#### **Composición:**

Caldo corazón - cerebro de buey, peptona, cloruro de sodio, fosfato disódico, dextrosa, agua destilada.

**Preparación:**

Disolver 37 g del caldo corazón - cerebro en 1 L de agua destilada.

Distribuir en volúmenes de 8-10ml en tubos de tapa negra (rosca) y autoclavar a 121° C (15 libras de presión) por 15 minutos. Si el medio no se utiliza el mismo día, poner los tubos a calentar en baño maría por varios minutos hasta que se absorba el oxígeno, y enfriarlos rápidamente sin agitar, antes de realizar la inoculación. El pH final debe ser  $7.4 \pm 0.2$ .

**Caldo corazón - cerebro (BHIB) con 6,5% de NaCl****Composición:**

Al BHIB se le agrega NaCl.

**Preparación:**

Añadir 60g de NaCl por litro de medio de cultivo. Puesto que el preparado comercial de BHIB tiene NaCl, esta cantidad se resta de los 65g requeridos por litro de medio, para tener una concentración final de 6.5% de NaCl.

**Agar con el caldo corazón - cerebro (BHIA)****Composición:**

BHIA contiene los mismos componentes del BHIB.

Al BHIB se añade 15g de agar por litro de medio.

**Preparación:**

Suspender 52g de BHIA deshidratado en 1L de agua destilada. Hervir (con el calor se disuelven los ingredientes) y repartir 10ml de medio en tubos de ensayo. Autoclavar los tubos por 15 minutos a 121° C (15lbs de presión). Luego se inclinan los tubos, para que el medio adquiera la forma de pico de flauta, dejarlos en esa posición hasta que se solidifiquen. El pH final debe ser de  $7.4 \pm 0.2$ . Guardar en la nevera.

**Agar de Bilis Esculina(BEA)**

**Composición:**

Bilis de buey deshidratada, extracto de levadura, triptona, peptona, esculina, citrato ferroamónico, cloruro de sodio, Azida de sodio, agar bacteriológico. A este preparado se añade agua destilada.

**Preparación:**

Añadir 64g de BEA deshidratado a 1L de agua destilada, calentar hasta que hierva y se disuelva completamente. Repartir volúmenes de 10ml en tubos para inclinarlos posteriormente en forma de pico de flauta, en el caso de volúmenes más grandes colocarlos en frascos. Autoclavar a 121° C (15lbs de presión) por 15 minutos. Enfriar a 50 °C. El pH final debe ser de 6.6 ± 0.2. Guardar en la nevera.

**Colilert**

Es un reactivo utilizado mundialmente para la detección de coliformes y *E.coli*, su uso fue aprobado por EPA de EE.UU. como método estándar para analizar agua doméstica y aguas residuales (Maier, 2000; Pepper, 2004). Es un preparado comercial, fabricado por Idexx Laboratories.

**ANEXO II**

**FORMULARIO DE RECOLECCION DE MUESTRAS**

